

# Steroidi- ja Wnt-signaloinnin välinen vuoropuhelu ihmisen osteoblastisissa soluissa

Laura Mäkelä  
Pro gradu -tutkielma  
Soveltavan biotekniikan koulutusohjelma/  
Eläinbiotekniikan pääaine, Molekyylibiologian ja geeniteknologian linja  
Kuopion yliopisto, Biotieteiden laitos  
Kesäkuu 2008

**KUOPION YLIOPISTO**, Luonnontieteiden ja ympäristötieteiden tiedekunta  
Soveltavan biotekniikan koulutusohjelma, Eläinbiotekniikan pääaine,  
Molekyylibiologian ja geeniteknologian linja

**MÄKELÄ, LAURA**: Steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välinen vuoropuhelu ihmisen osteoblastisissa soluissa

Opinnäytetutkielma 75 sivua

Opinnäytetutkielman ohjaajat: FT Anitta Mahonen, FM Anu Olkku, professori Maria Halmekytö

Kesäkuu 2008

---

Avainsanat: Glukokortikoidi, kalsitrioli, Wnt,  $\beta$ -kateniini, osteoblasti, GR, VDR

Osteoporoosi on luusairaus, jolle on ominaista luuaineksen ja siten luun tiheyden väheneminen. Myös luun sisäinen rakenne on muuttunut; se on huokoistunut ja sen kestävyys on heikentynyt. Suomen Osteoporoosiliiton arvioiden mukaan Suomessa on noin 400 000 henkilöä, joilla luukudoksen määrä on merkittävästi alentunut.

Luustomme ei ole staattinen kokonaisuus, vaan se uusiutuu jatkuvasti. Uusiutuminen johtuu elävän kudoksen toiminnasta, jossa luuta hajottavat osteoklastit syövät luuta, ja luun muodostajasolut osteoblastit rakentavat uutta luuta tilalle. Luuston kehitykseen ja metaboliaan osallistuu useita eri biomolekyyliä ja signaalireittejä. Viimeaikaisten tutkimusten mukaan Wnt-signaali on aktiivinen luun metabolian säätelijä. Wnt-proteiinit aktivoivat ainakin kolme solun sisäistä signaalireittiä, joista kanonisen signaalireitin tiedetään vaikuttavan luun muodostumisen ja resorption kontrollointiin. Myös steroidihormoneilla tiedetään olevan monimuotoisia vaikutuksia luun metaboliaan. Esimerkiksi glukokortikoidit edistävät osteoblastisen fenotyypin kehittymistä ja siten mesenkymaalisten kantasolujen osteogeenistä erilaistumista. Toisaalta glukokortikoidit vaikuttavat kypsien osteoblastien toimintaan ja metaboliaan vähentämällä luun muodostumista. Steroidihormonien vaikutukset välittyvät usein systeemisellä tasolla, joten ne vaikuttavat useissa kudoksissa samanaikaisesti. Niiden vaikutukset välittyvät spesifisten reseptorien välityksellä, jotka toimivat ligandista-riippuvaisina transkriptiotekijöinä. Wnt-signaalireitin toiminnot vastaavasti välittyvät paikallisella tasolla. Molemmat signaalireitit kuitenkin osallistuvat solujen proliferaation, erilaistumisen ja selviytymisen kontrollointiin. Tämä viittaisi siihen, että soluilla on oltava mekanismeja, joiden avulla ne voivat yhdistää eri signaalireittien välittämät samansuuntaiset käskyt. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välisen vuoropuhelun molekulaarista mekanismia ihmisen osteoblastisissa soluissa. Steroidien osalta työssä keskityttiin glukokortikoideihin ja aktiiviseen D-vitamiiniin.

Wnt-signaalireitin aktivoitumista tutkittiin U2-Os -osteoblasteissa raportoijakokeilla ja  $\beta$ -kateniinin immunovärjäyskokeilla. Wnt-signaalireitti aktivoitui litiumkloridilla sekä transfektoimalla villityypin  $\beta$ -kateniinia tai stabiilia S<sup>33</sup>-kateniinia. Wnt-signaalireitin aktivoituminen johti  $\beta$ -kateniinin tumalokalisatioon. Työssä osoitettiin, että glukokortikoidit ja kalsitrioli heikensivät sekä LiCl-aktivoitua että  $\beta$ -kateniini-aktivoitua Wnt-signaalireittiä. Wnt-signaalin vaimentuminen johtui ainakin osittain siitä, että  $\beta$ -kateniinin translokisoituminen tumasta solukalvolle tehostui. Steroidireseptorien mutanteilla muodoilla kartoitettiin Wnt-signaalin modulointiin osallistuvia reseptorin alueita. Tämän tutkimuksen perusteella GR:n DNA:han sitoutuvan alueen (DBD) aminohapot 418-500 ja VDR:n ligandia sitovan alueen (LBD) aminohapot K264 ja E420 näyttäisivät osallistuvan Wnt-signaaloinnin modulointiin.

## ESIPUHE

Tein pro gradu -työni vuosien 2006 ja 2007 aikana lääketieteellisen biokemian yksikössä, Anitta Mahosen johtamassa ryhmässä.

Haluaisin kiittää ohjaajiani Anitta Mahosta, Anu Olkkua ja Biotieteiden laitoksen puolelta Maria Halmekytöä. Lisäksi haluaisin kiittää ystäviäni ja vanhempiani tuesta hetkillä, jolloin usko ja ymmärrys meinasivat loppua.

Kuopiossa 12.7.2008

Laura Mäkelä

## LYHENNELUETTELO

APC	engl. <i>adenomateous polyposis coli</i>
AR	androgeenireseptori
CKI	kaseiinikinaasi I
DBD	DNA:ta sitova domeeni
Dkks	engl. <i>Dickkopfs</i>
Dsh	engl. <i>Disheveled</i>
GBP	GSK3 $\beta$ : ta sitova proteiini
GIO	glukokortikoidien indusoima osteoporoosi
GR	glukokortikoidireseptori
GRE	glukokortikoidiresponsiivinen elementti
GSK3 $\beta$	glykogeenisyntaasikinaasi 3 $\beta$
HDAC1	engl. <i>histone deacetylase 1</i>
LBD	ligandia sitova domeeni
LDLR	engl. <i>low-density lipoprotein related receptor</i>
Lef	engl. <i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
NTD	N-terminaalinen alue
PDE	fosfodiesteraasi
PLC	fosfolipaasi C
RXR	retinoidi-X-reseptori
Sfrps	engl. <i>secreted frizzled related proteins</i>
TCF	T-solutekijä
VDR	D-vitamiinireseptori
VDRE	D-vitamiiniresponsiivinen elementti
Wif-1	Wnt:tä inhiboiva tekijä -1 (engl. <i>Wnt inhibitory factor-1</i> )

## **TIIVISTELMÄ**

## **ESIPUHE**

## **LYHENNELUETTELO**

## **SISÄLLYSLUETTELO**

<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 KIRJALLISUUSKATSAUS</b> .....	<b>8</b>
2.1 Luukudos .....	8
2.1.1 Luusolut .....	10
2.1.2 Luun uudismuodostus ja luuston sairaudet .....	12
2.2 Steroidihormonit .....	14
2.3 Steroidihormonireseptorien rakenne .....	16
2.3.1 N-terminaalinen domeeni .....	17
2.3.2 DNA:ta sitova domeeni .....	17
2.3.3 Ligandia sitova domeeni .....	18
2.4 Steroidihormonien reseptorivälitteinen vaikutusmekanismi .....	19
2.5 Wnt-proteiinit ja signaalinvälittyminen .....	21
2.5.1 Wnt-proteiinien rakenne .....	21
2.6 Wnt-reseptorit .....	22
2.7 Wnt-signaalireitit .....	23
2.7.1 Ei-kanoniset signaalireitit .....	23
2.7.2 Kanoninen signaalireitti .....	24
2.8 Wnt-signaaloinnin kohdegeenit .....	27
2.9 Wnt-antagonistit .....	27
<b>3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET</b> .....	<b>28</b>
<b>4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b> .....	<b>29</b>
4.1 Solukokeet.....	29
4.1.1 U2-Os -solujen kasvatus ja jakaminen .....	29
4.1.2 Tutkittavat yhdisteet .....	29
4.2 Transfektio- ja transkriptio-koekokeet .....	30
4.2.1 Transfektiossa käytetyt raportioija-konstruktit ja ekspressiovektorit .....	30
4.2.2 Transfektio <i>TransIT</i> <sup>®</sup> LT1 -lipofektio- ja <i>FuGENE</i> <sup>®</sup> HD-transfektioagenssilla .....	31
4.2.3 Lusiferaasi-määritys .....	32
4.2.4 $\beta$ -galaktosidaasi-määritys .....	32
4.2.5 Proteiinipitoisuuden määrittäminen .....	33
4.3 Immunofluoresenssivärjäys .....	33
4.4 Kvantitatiivinen PCR .....	34
4.4.1 Kokonais-RNA:n eristys .....	34
4.4.2 cDNA-synteesi .....	35
4.4.3 Kvantitatiivinen-PCR -ajo .....	36
<b>5 TULOKSET</b> .....	<b>37</b>
5.1 Raportioijakokeiden analysointi.....	37
5.2 Wnt-signaalintireitin toiminta ja aktivaatio ihmisen osteoblastissa U2-Os-soluissa ..	37
5.3 Glukokortikoidit ja kalsitrioli heikentävät Wnt-signaalointia U2-Os-soluissa .....	40

5.4 Glukokortikoidit ja kalsitrioli translokalisoivat $\beta$ -kateniinia U2-Os-soluissa.....	43
5.5 hGR- ja hVDR-mutantit moduloivat Wnt-signaalointia.....	44
5.6 Wnt-signaalointireitti vaikuttaa kalsitrioliaktivoituun OCN-geenin luentaan .....	49
5.7 Kalsitriolin ja Wnt-signaloinnin vaikutukset OCN-geenin mRNA-tasoihin.....	50
6 <i>POHDINTA</i> .....	52
7 <i>LÄHTEET</i> .....	58

# 1 JOHDANTO

Ihmisen luusto rakentuu yli 200 erimuotoisesta ja – kokoisesta luusta, joiden osuus ruumiinpainosta on noin 20 %. Luusto toimii kehomme tukirankana ja mahdollistaa yhdessä lihasten kanssa kehomme liikkeen. Luut muodostavat vipuvarsia, jotka liikkuvat suhteessa toisiinsa nivelten toimiessa akseleina. Luusto antaa suojan kehomme tärkeille elimille, kuten aivoille ja luuytimelle. Luusto on myös tärkeä kalsium-, fosfaatti- ja magnesiumvarasto. Elimistömme kalsiumista on noin 99 % varastoituneena luustoon. (Haug ym. 1994 s. 230- 231).

Sikiökaudella luusto kehittyy joko rustoisesta mallista (endokondraalinen eli välillinen luutuminen) tai suoraan sidekudoksesta (sidekudossyntyinen eli välitön luutuminen) (Niemi & Väänänen 1993). Suurin osa luistamme rakentuu rustokudoksesta. Välillisessä luutumisessa mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat ensin rustosoluiksi. Tämän jälkeen rusto kalkkiutuu, siihen syntyy luutumistumakkeita ja rustoinen malli tuhoutuu muodostuvan luun tieltä. Rustoa jää kuitenkin luiden kasvuvyöhykkeille, jotta luun pituuskasvu olisi myöhemmin mahdollista. Luutuminen kestää pitkään ja vastasyntyneellä osa luustosta onkin vielä rustoista. Välittömässä luutumisessa mesenkymaalinen sidekudos tiivistyy ja alueelle syntyy uusia verisuonia, jotka kuljettavat happea ja ravinteita. Mesenkymaaliset solut erilaistuvat suoraan osteoblasteiksi, jotka tuottavat mineralisoituvan soluväliaineen suoraan sidekudokseen. Välittömän luutumisen kautta muodostuvat useat kallon ja kasvojen luut sekä litteät luut. (Baron 1993 s. 8-9).

Luustomme ei ole staattinen kokonaisuus, vaan se uusiutuu jatkuvasti. Luu on elävää kudosta, jossa luuta hajottavat osteoklastit syövät luuta, ja luun muodostajasolut osteoblastit rakentavat uutta luuta tilalle. Lapsilla ja nuorilla luun muodostus on nopeampaa kuin luun hajoaminen. Tämä mahdollistaa luiden jatkuvan kasvun eli luukudoksen määrän lisääntymisen. Yksilön ikääntyessä luun muodostuminen alkaa tasaantua ja noin 40 vuoden iässä luun hajoaminen vähitellen kiihtyy luun muodostumista nopeammaksi. Naisilla luumassan väheneminen kiihtyy selvästi vaihdevuosien jälkeen, ja arviolta puolet luumassasta on menetetty 80 vuoden ikään mennessä. Miehillä luumassan väheneminen ei ole yhtä huomattavaa kuin naisilla ja

luumassasta arvioidaan häviävän noin 25- 30 % 80 vuoden ikään mennessä. (Väänänen 1996, s. 2087).

Osteoporoosi on luusairaus, jolle on ominaista luuaineksen ja siten luun tiheyden väheneminen. Myös luun sisäinen rakenne on muuttunut; se on huokoistunut ja sen kestävyys on heikentynyt. Suomen Osteoporoosiliiton arvioiden mukaan Suomessa on noin 400 000 henkilöä, joilla luukudoksen määrä on merkittävästi alentunut. (Suomen Osteoporoosiliitto ry 2008, Verkkodokumentti).

Luuston kehitykseen ja metaboliaan osallistuu useita eri biomolekyyliä ja signaalireittejä. Viimeaikaisten tutkimusten mukaan Wnt-signaalointi on aktiivinen luun metabolian säätelijä. Wnt-proteiinit aktivoivat ainakin kolme solun sisäistä signaalireittiä, joista ns. kanonisen signaalireitin tiedetään vaikuttavan luun metaboliaan (Glass & Karsenty 2006). Wnt-signaalireittien toiminnot välittyvät paikallisella tasolla. Myös steroidihormoneilla tiedetään olevan monimuotoisia vaikutuksia luun metaboliaan (Zallone 2006; Conradie ym. 2007). Steroidihormonien vaikutukset välittyvät systeemisellä tasolla, joten ne vaikuttavat useissa kudoksissa samanaikaisesti. Niiden vaikutukset välittyvät spesifisten reseptorien välityksellä, jotka toimivat ligandista-riippuvaisina transkriptiotekijöinä. Koska useat biomolekyylit ja signaalireitit säätelevät solujen proliferaatiota ja erilaistumista, viittaisi tämä siihen, että soluilla on oltava mekanismeja, joiden avulla ne voivat yhdistää eri signaalireittien välittämät käskyt. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää näitä mekanismeja steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välillä.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Luukudos

Luukudoksen rakenne vaihtelee luuston eri osissa. Pitkien luiden varsiosat ja kaikkien luiden pintaosat ovat tiivistä luuta eli kortikaalista luuta. Tiivis luu koostuu pääasiassa kalkkeutuneesta väliaineesta, josta voidaan erottaa ohuita luulamalleja. Kerroksittaiset luulamellit muodostavat rengasmaisia osteoneja, joiden keskelle jäävää onteloa nimitetään Haversin kanavaksi (kuva 1). Osteoneihin nähden poikittain kulkevia Haversin kanavan haaroja kutsutaan Volkmannin kanaviksi. Kanavat toimivat

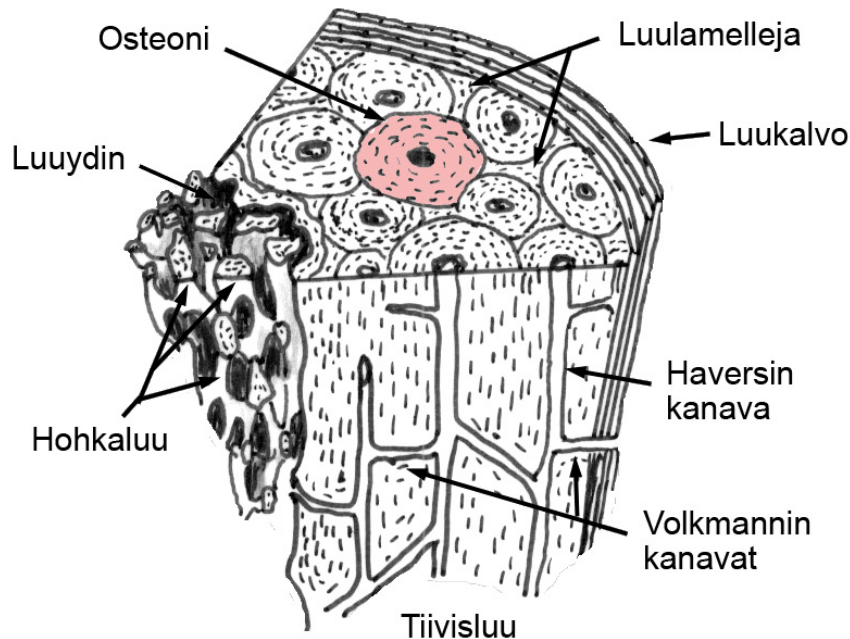


verisuonten, imusuonten ja hermojen kulkureitteinä. Osteosyytit ovat luulamellien välissä olevissa lakunoissa, joita yhdistävät toisiinsa luusolukanavat. (Baron 1993 s. 3-4). Luiden päät, pienten luiden sisäosat ja nikamat muodostuvat vastaavasti hohkaluusta eli trabekulaarisesta luusta. Hohkaluu on huokoista luuta, joka on muodostunut kaarevista, haaraantuneista ja toisiinsa liittyneistä luupalkeista ja luuytimen täyttämästä välitilasta (kuva 1).

Luukudos on pitkälle erikoistunutta sidekudosta. Se koostuu mineralisoituneesta proteiinirikkaasta solun ulkoisesta tilasta, sekä luun soluista. Kemiallisesti luukudos voidaan jakaa epäorgaaniseen ja orgaaniseen ainekseen. (Baron 1993 s. 3-4). Luukudoksen epäorgaaninen aines eli mineraaliosa muodostaa noin 65 % luukudoksen kuivapainosta (Gartner & Hiatt 2001, s. 65-66). Merkittävin osuus on kalsiumfosfaatilla, josta valtaosa edelleen on kiteisenä hydroksiapatiittina  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ . Hydroksiapatiittikiteet asettuvat kollageenikuitujen väliin siten, että muodostuu erittäin luja ja sitkeä komposiittirakenne. (Bonucci 2000; Heath & Young 2000, s. 175-179).

Orgaaninen aines muodostaa noin 35 % luukudoksen kuivapainosta (Gartner & Hiatt 2001, s. 65-66). Selvästi suurin osuus on tyypin I kollageenilla, joka kattaa 80-90 % orgaanisesta aineksestä. Tyypin I kollageeni tukee luun rakennetta ja antaa mekaanista kestävyyttä (Alford & Hankenson 2006). Orgaaninen aines sisältää myös muita luuproteiineja kuten osteopontiinia, osteonektiinia ja osteokalsiinia. Osteopontiini on ns. adheesioproteiini, joka välittää luusolujen tarttumista väliaineen mineralisoituneisiin proteiineihin RGD (arginiini-glysiini-asparagiinihappo)– sekvenssin avulla. Osteopontiinin on lisäksi havaittu osallistuvan luun mineralisaatioon (Kazanecki ym. 2007) sekä luun kantasolujen erilaistumisen säätelyyn (Stier ym. 2005). Osteonektiini välittää solu-väliaine vuorovaikutuksia sitoutumalla väliaineen kollageeniin ja hydroksiapatiittiin (Lane & Sage 1994; Rammelt ym. 2004). Se pystyy stimuloimaan myös angiogeneesiä ja väliaineen metalloproteaasien tuotantoa (Shankavaram ym. 1997; Framson & Sage 2004). Osteokalsiini on osteoblastien tuottama GLA-proteiini, joka on luustospesifinen merkkiaine. Osteokalsiinin uskotaan osallistuvan ainakin osteoblastien aktiivisuuden ja luun muodostuksen säätelyyn. Osteokalsiini pystyy sitomaan kalsiumioneja ja kiinnittymään luun hydroksiapatiittiin. (Kaartinen 1999; Wada ym. 2007). Orgaaninen aines sisältää lisäksi useita kasvutekijöitä, entsyymejä, proteoglykaaneja ja glykoproteiineja. Eräs tärkeä glykoproteiini on fibronektiini, joka

kiinnittää luusoluja ja väliaineen komponentteja toisiinsa RGD-sekvenssin välityksellä. Fibronektiiniä tuotetaan useassa vaiheessa luun muodostuksen aikana (Tang ym. 2007). Proteoglykaanit puolestaan säätelevät väliaineen mineralisaatiota, ja osallistuvat väliaineen aineenvaihduntaan yhdessä useiden kasvutekijöiden ja sytokiinien kanssa (Müller ym. 2008).



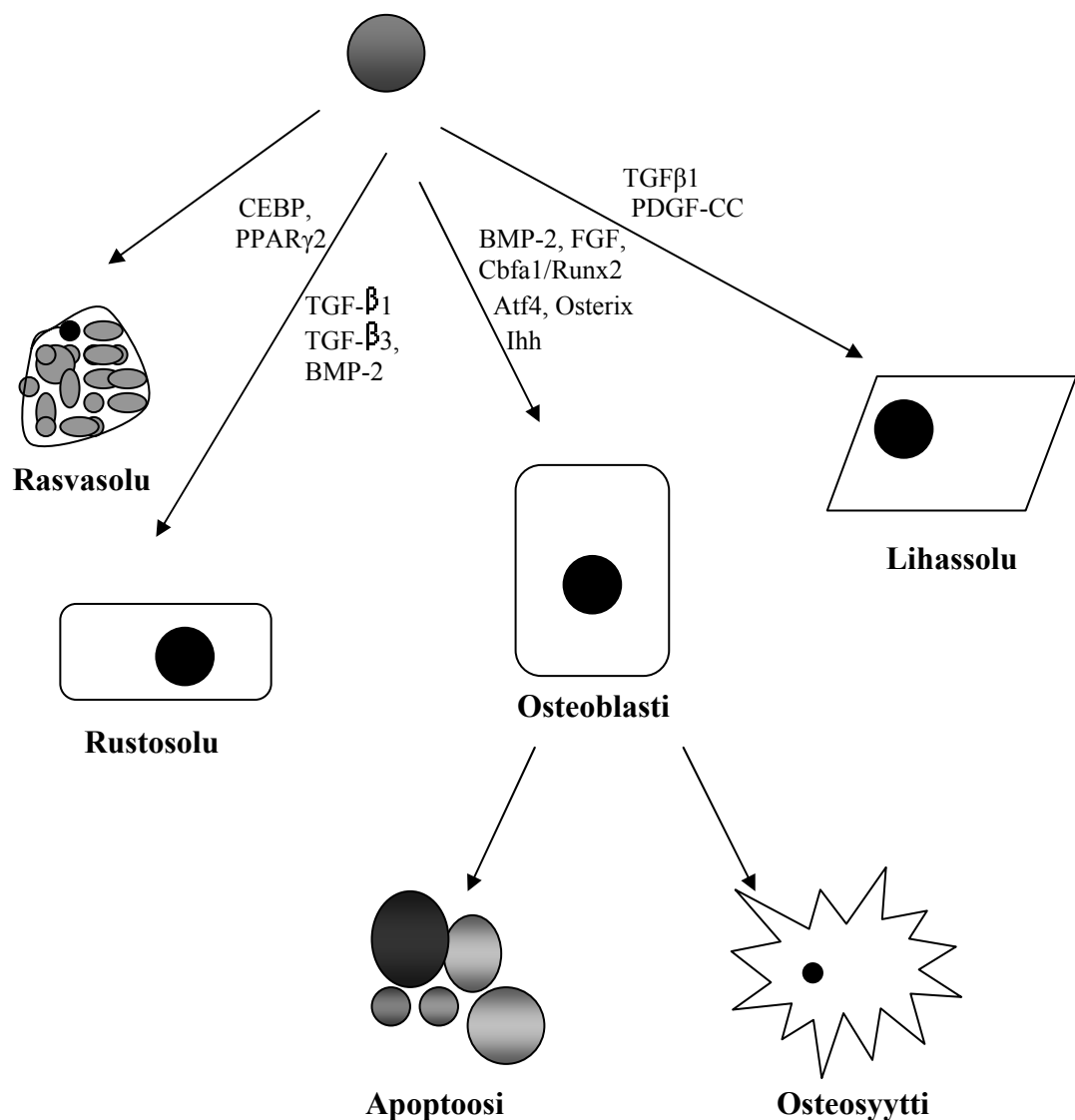
Kuva 1. Luun rakenne. Kerroksittaiset luulamellit muodostuvat rengasmaisia osteoniyksiköitä (punainen). Luulamelleja on myös osteonien välitiloissa. Osteosyytit sijaitsevat luulamellien välisissä lakunoissa, joita yhdistävät toisiinsa luusolukanavat. (Queen Mary University of London 2008, Verkkodokumentti).

### 2.1.1 Luusolut

Luusta voidaan erotella morfologisesti ja toiminnallisesti kolme eri solutyyppiä: osteoblastit, osteosyytit, ja osteoklastit. Osteoblastit ovat peräisin luuytimen pluripotentista mesenkymaalisista kantasoluista, jotka pystyvät erilaistumaan myös rasvasoluiksi, rustosoluiksi tai lihassoluiksi (kuva 2) (Muraglia ym. 2000). Erilaistumislinjan valintaan vaikuttavat useat eri kasvutekijät ja hormonit, jotka vaikuttavat kohdegeenien luentaan eri transkriptiotekijöiden, koaktivaattoreiden ja -repressoreiden välityksellä (de Crombrughe ym. 2000; Rosen & Spiegelman 2000; Wagner & Karsenty 2001). Osteoblastisen linjan erilaistumista kontrolloivat ainakin Runx2/Cbfa1-, Atf4- ja Osterix -transkriptiotekijät, jotka sitoutuvat osteoblasteille spesifisten geenien promoottorialueille. Näiden tekijöiden aktivoituminen johtaa edelleen mm. kohonneeseen alkaalisen fosfataasin ja osteokalsiinin ilmentämiseen.

(David ym. 2007). Osteblastit ovat kuutiomaisia ja polarisoituneita soluja. Metabolisesta aktiivisuudesta kertovat suuri solukalvosto ja useat Golgin laitteet. Osteblastit syntetisoivat luun kollageenipitoisen väliaineen ja huolehtivat sen mineralisaatiosta. Lisäksi osteblastit kontrolloivat osteoklastien erilaistumista (Westerndorf ym. 2004). Osa osteoblasteista hautautuu valmistamansa väliaineen sisään ja muuntuu osteosyyteiksi. Muuntumiseen vaikuttavat mahdollisesti luutumistapa (välillinen/välitön), luutyyppejä sekä yksilön ikä ja sukupuoli. (Franz-Odenaal ym. 2006).

### Mesenkymaalinen kantasolu



Kuva 2. Mesenkymaaliset kantasolut pystyvät erilaistumaan rasvasoluiksi, rustosoluiksi, osteoblasteiksi ja lihassoluiksi. Erilaistumislinjan valintaan vaikuttavat useat eri kasvutekijät ja hormonit, jotka vaikuttavat kohdegeenien luetaan transkriptiotekijöiden välityksellä. Osteoblastisen linjan erilaistumista kontrolloivat ainakin Runx2/Cbfa1-, Atf4- ja Osterix -transkriptiotekijät. Suurin osa kypsistä

osteoblasteista ohjautuu apoptoosiin, mutta pieni osa hautautuu valmistamansa väliaineen sisään ja muuntuu osteosyyteiksi.

Osteosyyttien metabolinen aktiivisuus laskee merkittävästi siinä vaiheessa, kun ne ovat täysin hautautuneina väliaineeseen. Osteosyytit ovat yhteydessä toisiinsa ja luun pinnan soluihin solu- ulokkeidensa välityksellä, jotka kulkevat pienissä luusolukanavissa (canaliculi). (Zhang ym. 2006). Nämä kanavat toimivat ainoina ravinteiden ja kaasujen vaihtoreitteinä. Osteosyyttien uskotaan säätelevän luun uudismuodostusta inhiboimalla osteoklastien toimintaa (Hazenbergen ym. 2007). Lisäksi osteosyytit tunnistavat luukudokseen kohdistuvan mekaanisen stressin ja välittävät siitä tiedon muille luusoluille (Burger & Klein-Nulend 1999; Jiang ym. 2007).

Osteoblasteista poiketen osteoklastit erilaistuvat hematopoeettisista kantasoluista (Aubin & Bonnelye 2000; Bar-Shavit 2007). Osteoklastit ovat monitumaisia soluja, jotka muodostuvat yksitumaisten esiasteiden fuusioitumisen seurauksena. Aktiivisten osteoklastien rakenteelle ominainen piirre on poimukalvosto, joka toimii solujen resorpoivana pintana. (Aubin & Bonnelye 2000; Bar-Shavit 2007). Osteoklastien tehtävänä on hajottaa luuta luun uudismuodostuksessa. Osteoklastit erittävät protoneja poimukalvostolta resorpoitavan luun pinnalle. Protonit happamoivat luun pinnan ja liuottavat väliaineen mineraaleja. Osteoklastien erittämät proteolyyttiset entsyymit pilkkovat edelleen väliaineen orgaanisen aineksen, kuten kollageenin. (Bar-Shavit 2007; Feng ym. 2008).

### **2.1.2 Luun uudismuodostus ja luuston sairaudet**

Luun uudismuodostus alkaa luuta syövien osteoklastien aktivoitumisella. Aktivoituneet osteoklastit vaeltavat luun resorptipaikalle ja kiinnittyvät mineralisoituneeseen väliaineeseen muodostamalla tiiviin vyöhykkeen. Osteoklastien kalvoston alle muodostuu resorptiolakuuna, johon osteoklastit pumppaavat protoneja. Protonien vaikutuksesta alueen pH laskee ja luun väliaineen mineraalit liukenevat. (Bar-Shavit 2007; Zhao & Patrick Ross, 2007; Feng ym. 2008). Samalla resorptiolakuunaan tuotetaan proteaasi-entsyymejä (erityisesti katepsiini K), jotka pilkkovat väliaineen orgaanista materiaalia kuten kollageenia. Soluväliaineen osittain hajonnut materiaali otetaan sisään osteoklasteihin, kuljetetaan solun läpi transsytoosimenetelmällä ja vapautetaan soluvälitilaan. (Bar-Shavit 2007; Feng ym. 2008). Kun osteoklastit ovat

tällä tavoin poistaneet vanhan luukudoksen, korvaavat luuta muodostavat osteoblastit poistetun luun uudella luukudoksella (Aubin & Bonnelye 2000).

Luun muodostumista ja resorptiota kontrolloidaan sekä paikallisella että systeemisellä tasolla. Paikallisella tasolla säätely perustuu luusolujen erittämiin tekijöihin. Näitä ovat esimerkiksi osteoblastien erittämät makrofagien tuotantoa stimuloiva tekijä (M-CSF) ja RANK-ligandi, jotka ovat välttämättömiä osteoklastien erilaistumiselle ja toiminnalle (Yasuda ym. 1999; Bar-Shavit 2007). Osteoklastien kantasolut sekä kypsät osteoklastit ilmentävät RANK-ligandin reseptoria. RANK-ligandin sitoutuminen reseptoriinsa M-CSF:n läsnäollessa käynnistää osteoklastien kantasolujen fuusioitumisen ja erilaistumisen kypsiksi osteoklasteiksi. Osteoblastit tuottavat lisäksi osteoklastien erilaistumista inhiboivaa tekijää, liukoista reseptoria eli osteoprotegeriinia (OPG). OPG pystyy sitomaan RANK-ligandia ja estää näin osteoklastien muodostumisen ja aktivoitumisen. (Simonet ym. 1997; Bar-Shavit 2007).

Luun hajoamisen ja muodostumisen välillä vallitsee tarkoin säädelty tasapaino. Tasapainon häiriintyminen johtaa luumassan muutoksiin ja mahdollisesti luusairauksien kehittymiseen. Luusairauksien kehittyminen saattaa aiheutua myös perinnöllisen geenivirheen seurauksena. Osteoporoosi eli luukato on sairaus, jossa luun määrä vähenee ja luun lujuus heikkenee. Seurauksena on luun haurastuminen ja alttius saada murtumia. Osteoporoosi voi olla systeemistä, koko luuston tasolla tapahtuvaa luun haurastumista tai paikallista tietyn raajan käyttämättömyyteen liittyvää osteoporoosia. Lisäksi puhutaan primaarisesta ja sekundaarisesta osteoporoosista. Primaarinen osteoporoosi on useimmiten systeemisellä tasolla ilmenevää, vanhenemiseen liittyvää luuston heikkenemistä ja luumassan vähenemistä. Primaarinen osteoporoosi voidaan edelleen jakaa kahteen eri alatyyppiin. (Riggs & Melton 1986). Tyypin 1 osteoporoosi eli postmenopausaalinen osteoporoosi ilmenee ikääntyvillä naisilla ja johtuu estrogeenivajeen aiheuttamasta osteoklastien aktivoitumisesta. Tyypin 2 osteoporoosin eli seniilin osteoporoosin uskotaan johtuvan osteoblastien toiminnan heikkenemisestä ikääntymisen myötä. Sekundaarisella osteoporoosilla tarkoitetaan muusta kuin ikääntymisestä johtuvaa luuston heikkenemistä. Syinä saattavat esimerkiksi olla endokriininen häiriö, kasvain, ravitsemukselliset häiriöt tai lääkkeet kuten glukokortikoidit. (Painter ym. 2006).

Pitkäaikainen glukokortikoidilääkitys aiheuttaa luukatoa (Kaji ym. 2006). Glukokortikoideja käytetään mm. autoimmuunisairauksien ja tulehdustilojen hoidossa. Glukokortikoidien aiheuttama luukato on monimutkainen prosessi, jonka mekanismeja ei vielä täysin tunneta. Epäillään, että glukokortikoidit vaikuttaisivat suoraan osteoblastien ja osteoklastien erilaistumiseen sekä toimintaan. Glukokortikoidit tehostavat RANK-ligandin muodostumista, joka edistää kantasolujen fuusioitumista ja erilaistumista kypsiksi osteoklasteiksi. Toisaalta glukokortikoidit inhiboivat osteoblastien proliferaatiota, erilaistumista ja toimintaa. Osteoblastien apoptoosin uskotaan myös kiihtyvän. Näin ollen osteoblastien määrä vähenee suhteessa osteoklasteihin, jolloin luun muodostuminen vähenee. (Hakeda 2006). Glukokortikoidien indusoima osteoporoosi (GIO) onkin vakava ongelma potilailla, joilla on pitkäkestoinen kortisolilääkitys. (Woolf 2007).

Osteopetroosi eli luun kovettumissairaus on perinnöllinen luusairaus, joka johtaa vastakkaiseen ilmiöön kuin osteoporoosi, luumassan kasvuun. Luumassan kasvu johtuu häiriöistä osteoklastien toiminnassa ja/tai kehittämisessä. Tämä johtaa edelleen tehottomaan luun resorptioon. Osteopetroosille on ominaista luun kovettumisen ohella kasvanut murtumataipumus. (Askmyr ym. 2008). Osteogenesis imperfecta (OI) eli perinnöllinen luustonhauraus on harvinainen sidekudoksen ja luuston sairaus. OI johtuu perinnöllisestä geenivirheestä, jonka vuoksi luun väliaineen kollageenin rakenne on viallinen. (Glorieux 2007).

## **2.2 Steroidihormonit**

Steroidihormoneihin kuuluvat sukupuolihormonit, lisämunuaisen kuoren hormonit sekä kalsitrioli (Taulukko 1). Steroidihormonien synteesissä käytetään lähtöaineena kolesterolia. Ihmisellä steroidihormoneja tuottavat lisämunuaiskuori, sukupuolirauhaset ja istukka. Näissä kudoksissa on spesifisiä entsyymejä, jotka ratkaisevat mitä steroidihormonia kudoksessa tuotetaan. D-vitamiinia muodostuu ihon keratinosyyteissä UV-valon vaikutuksesta. Steroidihormonit säätelevät monia elimistön toimintoja energia- ja elektrolyyttitasapainon ylläpidosta sukupuoliseen erilaistumiseen ja lisääntymistoimintojen ylläpitoon. (Haug ym. 1994 s. 192) Tässä työssä keskitytään steroidihormonien osalta glukokortikoideihin ja D-vitamiiniin.

Taulukko 1. Ihmisen tärkeimmät steroidihormonit ja niiden valmistuspaikat

<b>Estrogeenit</b> (estradioli, estroni, estrioli)	munasarjat, istukka (lisämunuaisen kuori)
<b>Androgeenit</b> (testosteroni, 17- hydroksiprogesteroni, pregnenoloni)	kivekset (lisämunuaisen kuori)
<b>Progesteroni</b>	munasarjat, istukka, (lisämunuainen, kivekset)
<b>Glukokortikoidit</b> (kortisoli)	lisämunuaisen kuori
<b>Mineralokortikoidit</b> (aldosteroni)	lisämunuaisen kuori
<b>Kalsitrioli</b>	iholla UV-valon vaikutuksesta (ravinnosta)

Glukokortikoidit ovat lisämunuaisen kuorikerroksen erittämiä kortikosteroideja. Ihmisen tärkein glukokortikoidi on kortisoli, joka osallistuu mm. kasvun, kehityksen ja homeostaasin ylläpitoon (Atanasov & Odermatt 2007). Glukokortikoidien tiedetään vaikuttavan luun metaboliaan (Hakeda 2006; Conradie ym. 2007), mutta niiden vaikutusmekanismeja ei vielä täysin tunneta. Vaikutusmekanismi näyttäisi olevan riippuvainen osteoblastin kypsyysasteesta, lajikohtaisista eroista, käytetyn steroidin konsentraatiosta, hormonilisäyksen ajoituksesta sekä muiden hormonien läsnäolosta (De Nijs 2008; Pierotti ym. 2008). Glukokortikoidien tiedetään edistävän osteoblastisen fenotyypin kehittymistä ja siten vaikuttavan mesenkymaalisten kantasolujen osteogeeniseen erilaistumiseen (Nuttelman ym. 2006). Kuitenkin luukudoksen jatkuva altistus näille steroideille vähentää luun muodostumista, inhiboimalla proliferaatiota ja toisaalta edistämällä apoptoosia osteoblastisissa soluissa (Walsh ym. 2001; Hakeda 2006). Tiedetään myös, että glukokortikoidit inhiboivat Runx2/Cbfa1-transkriptiotekijän ilmentymistä, joka on osteoblastisen solulinjan kehittymisen kannalta merkittävä

transkriptiotekijä (Ohnaka ym. 2005). Glukokortikoidit vaikuttavat glukokortikoidireseptorin (GR) kautta, joka kuuluu tumareseptoreiden superperheeseen.

D<sub>3</sub>-vitamiini on rasvaliukoinen vitamiini, jota saadaan ravinnosta ja tuotetaan ihmisen ihossa UV-valon vaikutuksesta. D<sub>3</sub>-vitamiinin eli kolekalsiferolin biologisesti aktiivisin aineenvaihduntatuote on kalsitrioli (1,25-dihydroksivitamiini D<sub>3</sub>) (Nezbedova & Brtko 2004). Se osallistuu mm. kalsiumin imeytymiseen ohutsuolesta. *In vitro*-kokeissa on havaittu, että kalsitrioli inhiboi osteoblastien proliferaatiota ja stimuloi useiden luuväliaineen proteiinien, kuten osteokalsiinin, osteopontiinin ja alkaalisen fosfataasin, tuotantoa. Näitä proteiineja pidetäänkin tyypillisinä kypsyvien osteoblastien markkereina. (Atkins ym. 2003). Lisäksi kalsitriolin on havaittu edistävän mesenkymaalisten kantasolujen osteogeneesiä *in vitro* (Halvorsen ym. 2001; Hendy ym. 2006). Kalsitriolin anti-proliferatiiviset vaikutukset sekä useiden kohdegeenien transkriptionaalinen säätely välittyvät D-vitamiinireseptorin (VDR) välityksellä, jota ilmennetään osteoblasteissa (Ryhänen ym. 1998; van Leeuwen ym. 2001 ).

### 2.3 Steroidihormonireseptorien rakenne

Steroidihormonireseptorit kuuluvat tumareseptoreiden superperheeseen. Ihmisen tumareseptoriperhe käsittää ainakin 48 erityyppistä reseptoria, jotka toimivat lipofiilisten ligandien indusoimina transkriptiotekijöinä (McKenna ym. 2001; Escriva ym. 2004). Steroidihormonireseptorien alaryhmä koostuu klassisista steroidihormonireseptoreista: androgeenireseptori (AR), estrogeenireseptorit (ER $\alpha$  ja ER $\beta$ ), progesteronireseptori (PR), glukokortikoidireseptori (GR) ja mineralokortikoidireseptori (MR) sekä ei-steroidihormonireseptoreista: D-vitamiinin-, kilpirauhashormonin- ja retinoiinihaponreseptorit (Hammes & Levin 2007). Steroidihormonireseptorien rakenteesta voidaan erottaa neljä aluetta: N-terminaalinen alue (NTD), kahdesta sinkkisormesta koostuva DNA:han sitoutuva alue (DBD), sarana-alue ja C-terminaalinen ligandia sitova alue (kuva 3, kuva 7) (LBD).

GR-geenin silmukoinnissa muodostuu kaksi homologista reseptorimuotoa: GR $\alpha$  (777 aminohappoa) ja GR $\beta$  (742 aminohappoa). Reseptoreissa aminohapot 1–727 ovat samanlaisia. GR $\alpha$ :n aminohapot 728–777 käsittävät C-terminaalisen alueen, jossa on ligandin sitomisen kannalta kaksi merkittävää heliksirakennetta (H11 ja H12). GR $\beta$ :n C-



terminaalinen alue koostuu aminohapoista 728-742. C-terminaalinen alue sisältää ainoastaan yhden heliksirakenteen (H11) ja se ei pysty sitomaan ligandia. (Piotrowski ym. 2007; Schaaf ym. 2008). GR $\alpha$ :a ilmennetään lähes kaikissa ihmisen kudoksissa ja soluissa. Yleensä GR $\alpha$  käsitellään myös klassisena GR:na, joka toimii ligandista riippuvaisena transkriptiotekijänä. GR $\beta$ :a ilmennetään myös useissa ihmisen eri kudoksissa ja soluissa. GR $\alpha$  :sta poiketen se ei sido glukokortikoideja. GR $\beta$  pystyy inhiboimaan GR $\alpha$ :n transaktivaatiota tai transrepressiota sitoutumalla glukokortikoidiresponsiivisiin elementteihin (GRE) (Pujols ym. 2007; Solakidi ym. 2007).

### **2.3.1 N-terminaalinen domeeni**

Steroidihormonireseptorien NTD on vähiten konservoitunut. Sen pituus vaihtelee aina VDR:n 25 aminohaposta GR $\alpha$ :n yli 400 aminohappoon. (Orti ym. 1992; Baskakov ym. 1999). GR $\alpha$ :ssa on kaksi erillistä transaktivaatioaluetta AF-1 ja AF-2. Näistä AF-1 sijaitsee NTD:n ja AF-2 reseptorin LBD:n alueella (kuva 3, kuva 7). AF-1 transaktivaatioalue on riippumaton glukokortikoideista, kun taas vastaavasti AF-2 on glukokortikoidi-riippuvainen (Schaaf & Cidlowski 2002). AF-1-alue pystyy tunnistamaan yleisiä transkriptiotekijöitä kuten TFIID -kompleksin ja TATA -boksiin sitoutuvan proteiinin (TBP), mahdollisten adaptoriproteiinien välityksellä (Kumar ym. 2004; Copik ym. 2006). VDR:n NTD:lla ei ole AF-1 aktiivisuutta, mutta reseptorilla on aktiivinen AF-2-alue LBD:ssa (Rochel ym. 2000).

### **2.3.2 DNA:ta sitova domeeni**

Steroidihormonireseptorit sisältävät samankaltaisen, noin 66-70 aminohappoa pitkän DBD:n, joka sijaitsee reseptorin keskiosassa (kuva 3, kuva7) (Hu R ym. 2006). Vaikka DBD onkin hyvin homologinen steroidihormonireseptorien välillä, on se jokaiselle reseptorille silti spesifinen. DBD koostuu kahdesta silmukasta (sinkkisormesta), joissa 4 kysteiniinitähdettä on liittynään sinkkiatomiin. Rakenne eroaa muiden transkriptiotekijöiden sisältämistä sinkkisormista, jotka sisältävät kysteiniinitähteiden lisäksi mm. histidiinejä (Bredenberg & Nilsson 2002).

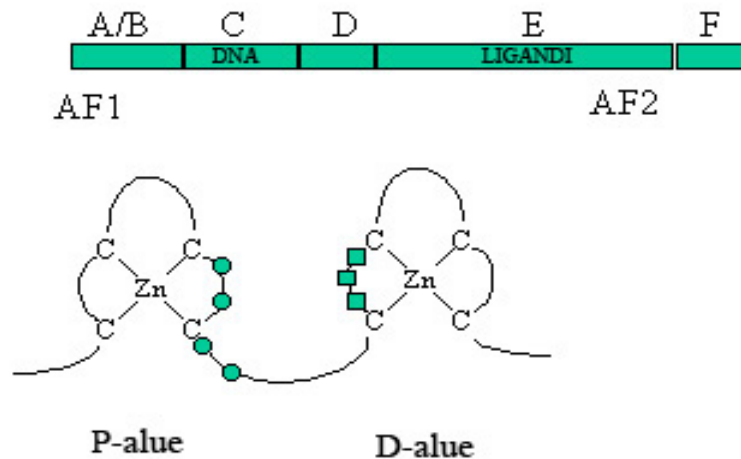
Reseptorin DBD:n tehtävänä on tunnistaa DNA:sta kyseiselle reseptorille ominainen responsiivinen elementti ja sitoa reseptori tähän elementtiin. GR sitoutuu kohdegeeniensä säätelyalueilla sijaitseviin GRE:hin ja VDR sitoutuu vastaavasti VDRE:hin. N-terminaalinen sinkkisormi on vastuussa spesifisen DNA-jakson tunnistamisesta. C-terminaalinen sinkkisormi vastaavasti stabiloi reseptorin sitoutumista ja dimerisoitumista N-terminaalisen sinkkisormen tunnistamaan DNA-jaksoon. N-terminaalisessa sinkkisormessa on kolmen aminohapon mittainen ns. P- alue, jolla on tärkeä merkitys reseptorien spesifisten responsiivisten elementtien löytämisessä. C-terminaalisessa sinkkisormessa on viiden aminohapon muodostama ns. D- alue, jolla on tärkeä rooli reseptorin dimerisaatiossa. (Bredenberg & Nilsson 2002).

### **2.3.3 Ligandia sitova domeeni**

Steroidihormonireseptorin C-terminaalisessa päässä sijaitsee noin 220-250 aminohapon mittainen LBD (kuva 3, kuva 7) (Orti ym. 1992). LBD koostuu 12  $\alpha$ -heliksistä, joista ainakin heliksit 3, 4 ja 12 osallistuvat ligandin sitomiseen (Lavery & McEwan 2005). LBD on reseptorin suurin alue ja sen tehtävänä on sitoa reseptorille spesifistä ligandia. Ligandin sitomisen lisäksi LBD osallistuu reseptorin homo- ja/tai heterodimerisaatioon sekä kohdegeenien transkription aktivointiin tai repressointiin. Osassa steroidihormonireseptoreista LBD osallistuu lämpöshokkiproteiineja sisältävän proteiini-kompleksin muodostamiseen solulimassa. (Robinson-Rechavi ym. 2003). GR on sitoutuneena lämpöshokkiproteiineihin, kun soluissa ei ole tarjolla ligandia. Vastaavasti VDR ei normaalioloissa sitoudu lämpöshokkiproteiineihin. Ligandin sitoutuminen aiheuttaa konformaatiomuutoksen LBD:ssa, jolloin C-terminaalisen pään  $\alpha$ -heliksi 12 (H12) sulkee ligandia sitovan taskun taipumalla muiden heliksien yhteyteen. H12 sijaitsee reseptorin transaktivaatioalueella AF-2 ja sen taipuminen muiden heliksien yhteyteen mahdollistaa vuorovaikutuksen transkriptiokoneiston ja koaktivaattoriproteiinien kanssa. (Norman, 1998; Kucera ym. 2002).

LBD:n ja DBD:n välillä on ns. sarana-alue. Sarana-alue antaa reseptorin rakenteelle joustavuutta ja osallistuu osassa steroidihormonireseptoreista lämpöshokkiproteiinien sitoutumiseen. Sarana-alue sisältää lisäksi tumalokalisaatiosignaalin, joka saattaa osittain olla DNA:ta sitovan domeenin alueella. (Robinson-Rechavi ym. 2003). Signaali

paljastuu, kun lämpöshokkiproteiinit dissosioituvat reseptorista ligandin sitoutumisen vaikutuksesta.



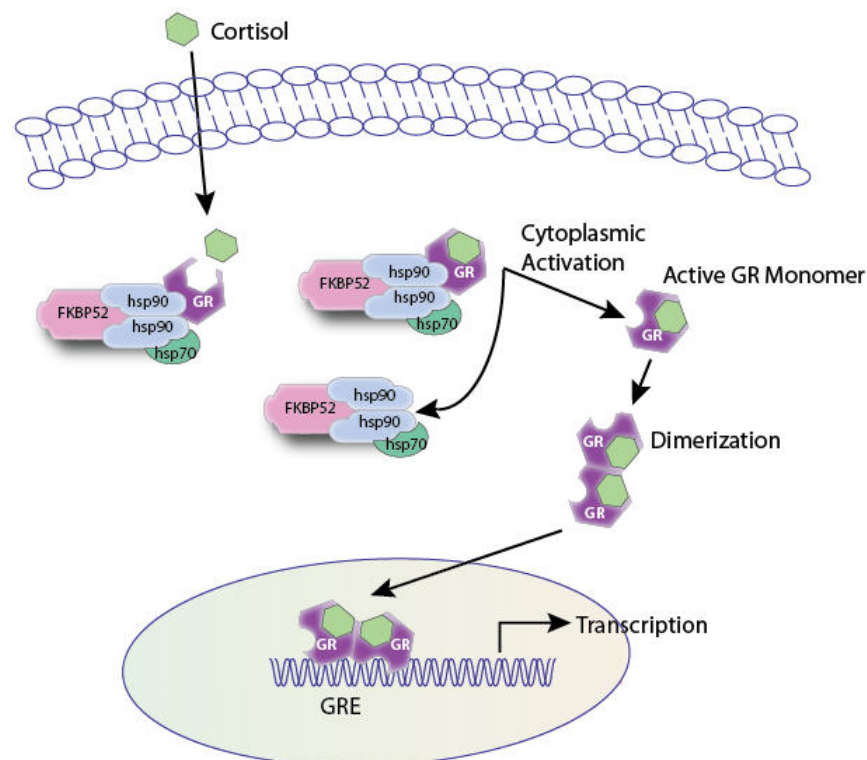
Kuva 3. Steroidihormonireseptorin rakenne. N-terminaalisessa päässä (A/B) sijaitsee GR:ssa transaktivaatioalue AF-1. DBD (C) sisältää kaksi silmukkaa (sinkkisormet), joista N-terminaalinen on ns. P-alue ja C-terminaalinen on ns. D-alue. (vihreät alueet). DBD:n ja LBD:n (E) välissä on ns. sarana-alue (D). Transaktivaatioalue AF-2 sijaitsee GR:ssa ja VDR:ssa LBD-alueella. Reseptorien LBD ja C-terminaalinen pää (F) osallistuvat ligandien sitomiseen. (Penn State College of Agricultural Sciences 2008, Verkkodokumentti).

## 2.4 Steroidihormonien reseptorivälitteinen vaikutusmekanismi

Vaikka steroidihormoneilla on toisistaan poikkeavia fysiologisia vaikutuksia, toimivat ne kaikki solussa samalla periaatteella. Rasvaliukoisina aineina ne läpäisevät solukalvon ja sitoutuvat spesifisiin reseptoreihinsa (kuva 4). Hormonin sitoutumisen seurauksena reseptorien rakenteessa tapahtuu muutoksia. Reseptorit dimerisoituvat ja ns. aktivoituvat, jonka jälkeen ne kiinnittyvät kohdegeenien säätelyalueilla sijaitseviin hormoniresponsiivisiin elementteihin. Reseptori-ligandi -kompleksin sitoutuminen kohdegeenien promoottorialueille voi edelleen joko aktivoida tai vaientaa kyseisen geenin transkriptiota.

Kun soluille ei ole tarjolla ligandia, on GR pääosin solulimassa sitoutuneena proteiinikompleksiin, joka sisältää mm. lämpöshokkiproteiineja (Hsp70, Hsp90), immunofiiliinejä ja p23-proteiinia (Wochnik ym. 2004). Ligandin sitoutuminen saa aikaan GR:n dissosioitumisen proteiinikompleksista, homodimerisaation ja translokalisoitumisen tumaan. Tumassa GR-homodimeeri sitoutuu kohdegeenien promoottorialueilla sijaitseviin GRE:hin ja säätelee näin kohdegeenien luentaa (Kumar & Thompson 2005; Kassel & Herrlich 2007).

VDR sijaitsee pääosin solun tumassa. Kalsitriolin sitoutuminen VDR:iin saa aikaan reseptorissa konformaatiomuutoksia. Nämä muutokset edistävät heterodimeerisen rakenteen muodostumista RXR:n kanssa sekä muiden transkriptionaalisten kofaktoreiden sitoutumista reseptoriin. Tämän jälkeen VDR-RXR heterodimeeri sitoutuu VDRE:hin ja vaikuttaa näin kohdegeenien luentaan. (Toell ym. 2000; Nezbedova & Brtko 2004).



Kuva 4. Steroidihormonien vaikutusmekanismi. Kortisolin sitoutuminen saa aikaan GR:n dissosioitumisen mm. lämpöshokkiproteiineja sisältävästä kompleksista, homodimerisaation ja translokalisoitumisen tumaan. Tumassa GR-homodimeeri sitoutuu kohdegeenien GRE:hin ja säätelee kohdegeenien luentaa. VDR sijaitsee pääosin solun tumassa ja se ei ole sitoutuneena lämpöshokkiproteiineihin. Kalsitriolin sitoutuessa VDR muodostaa heterodimeerin RXR:n kanssa, sitoutuu VDRE:hin ja vaikuttaa näin kohdegeenien luentaan. (Kuva: Panomics 2007, Verkkodokumentti )

## 2.5 Wnt-proteiinit ja signaalinvälittyminen

Wnt-proteiinit osallistuvat useiden solun toimintojen, kuten proliferaation, migraation, polaarisuuden ja geenien luennan kontrollointiin (Moon ym. 2002). Lisäksi monet Wnt-proteiinit ovat välttämättömiä embryogeenisille, mutta osallistuvat myös aikuisen kudosten uusiutumiseen. Näitä kudoksia ovat ainakin imukudos, paksusuoli, iho, karvatuppi ja luu (Brenz & Clevers 2000; Alonso & Fuchs 2003; Staal & Clevers 2003). Wnt-proteiinien fysiologista lähdettä luuta muodostavassa mikroympäristössä ei toistaiseksi tunneta. Eräs potentiaalinen lähde on solunulkopuolinen väliaine, joka saattaa vapauttaa Wnt-proteiineja. *In vitro*- tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että osteoblastit voivat tuottaa Wnt-proteiineja (Zhang ym. 2004).

### 2.5.1 Wnt-proteiinien rakenne

Wnt-proteiinit ovat kysteiinirikkaita, eritettäviä glykoproteiineja, joiden molekyylipaino vaihtelee 39-46 kDa:n välillä (Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Niiden sekvensseissä havaitaan homologiaa *Drosophila wingless* (wg)- ja rotan int-1 proto-onkogeenin kanssa. Wnt-proteiinien rakenne on toistaiseksi ollut vaikeasti selvitettävissä, koska ne ovat erittäin hydrofobisia, vaikeasti liuotettavia ja hankalia puhdistaa. Kaikkien Wnt-proteiinien tiedetään sisältävän 23- 24 kysteiinitähdettä, jotka luultavammin muodostavat rikkisiltoja ja/tai ovat posttranslationalisen modifioinnin kohteita. (Westendorf ym. 2004). Esimerkiksi Wnt3a-proteiinin aktiivisuuden kannalta konservoituneen kysteiinitähteen palmitylaatio on välttämätön. Tämä modifikaatio saattaa lisäksi olla osallisena Wnt-proteiinin kohdentamisessa solukalvolle. (Willert ym. 2003).

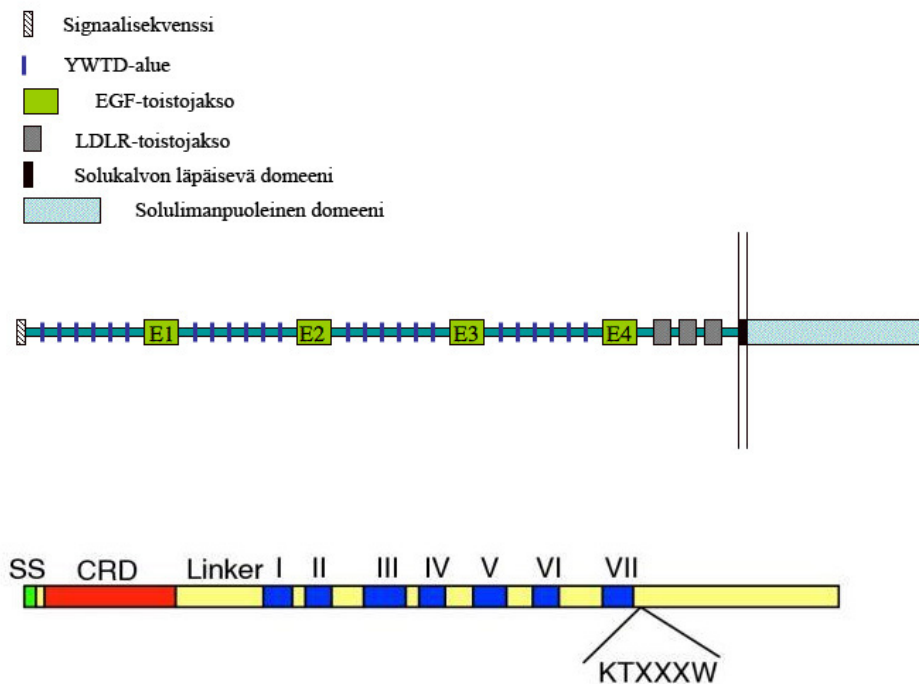
Ihmisen ja hiiren genomit koodittavat 19 erilaista Wnt-proteiinia (Miller 2001; Liu ym. 2007), jotka jaetaan toiminnallisesti eri luokkiin. Wnt1-luokan jäsenet: Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 ja Wnt8b, osallistuvat ns. kanonisen signaalireitin aktivoimiseen sitoutumalla Fzd- ja Lrp5/6-reseptoreihin (Westendorf ym. 2004; Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Wnt5a-luokan jäsenet: Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a ja Wnt11 sitoutuvat Fzd-reseptoriin ja aktivoivat heterotrimeerisiä G-proteiineja sekä Rho/Rac GTPaaseja (Westendorf ym. 2004).

## 2.6 Wnt-reseptorit

Wnt-proteiinien vaikutukset välittyvät Frizzled (Fzd)- ja Lrp5/Lrp6-reseptorin välityksellä (Bejsovec 2000). Lrp5 ja Lrp6 muodostavat yhdessä *Drosophila* Arrow-reseptorin kanssa low-density lipoproteiini reseptorien (LDLR) perheen. Näiden reseptorien tehtävänä on perinteisesti pidetty kolesterolihomeostaasin ylläpitoa ja makromolekyylien, kuten apolipoproteiinien ja proteaasien, endosytoosia klatrinipeitteisten kuopakkeiden välityksellä (Brown & Goldstein 1979).

Lrp5/6-reseptorit ovat pitkiä transmembraaniproteiineja, jotka lävistävät solukalvon kerran. Reseptorien rakenteesta voidaan erottaa neljä YWTD- toistojaksoa, joiden välissä on EGF: n (epidermaalinen kasvutekijä) kaltaisia domeeneja (kuva 5). Reseptorin C-terminaalisessa päässä on kolme LDLR A- tyyppin aluetta, kalvon läpäisevä alue ja soluliman puoleinen alue. (Semenov & He 2006). Soluliman puoleinen alue koostuu viidestä PPPS/TP- jaksosta. Wnt-proteiinin sitoutuminen Lrp5/6-reseptoriin aktivoi toistaiseksi tuntemattomia kinaaseja, jotka fosforyloivat reseptorin soluliman puoleisesta osasta ensimmäisen PPPS/TP- jakson. (Wolf ym. 2008). Reseptorin fosforylaatio johtaa mm. Axin- proteiinin kiinnittymiseen ja edelleen solunsisäisten Wnt-signaalireittien käynnistymiseen.

Ihmisen Fzd -geeni koodittaa kymmentä erilaista transmembraanista reseptoria, joiden pituus on 537- 706 aminohappoa. Näille reseptoreille on ominaista seitsemän kertaa solukalvon läpäisevä osa, sekä N-terminaalisen pään kysteiinirikas alue (CRD) (kuva 5). CRD-alue sijaitsee solun ulkopuolella ja osallistuu ligandien, kuten Wnt-proteiinien, sitomiseen. Reseptorin C-terminaalisessa päässä on Ser/Thr-Xxx-Val-motiivi, joka osallistuu fosforyloituneen Dsh:n aktivoimiseen ja sitomiseen. (Westendorf ym. 2004).



Kuva 5. Wnt-reseptorit. Yläkuvassa on esitetty Lrp5/Lrp6-reseptorien rakenne. Lrp5/6-reseptorien rakenteesta voidaan erottaa neljä YWTD- aluetta, joiden välissä on EGF-toistojaksoja. Reseptorin C-terminaaliosassa on kolme LDLR-toistojaksoa, solukalvon läpäisevä domeeni ja solulimanpuoleinen domeeni. Alakuvassa on Fzd-reseptori, jonka N-terminaaliosassa on kysteiniirikas domeeni (CRD). CRD osallistuu Wnt-proteiinien sitomiseen. Reseptorin keskellä on hydrofobiset alueet I-VII (sininen), jonka jälkeen on Ser/Thr-Xxx-Val-motiivi (KTXXXW). KTXXXW osallistuu Dsh:n aktivoimiseen ja sitomiseen. (Huang & Klein 2004, Verkkodokumentti).

## 2.7 Wnt-signaalireitit

Wnt-proteiinit osallistuvat ainakin kolmen erilaisen solunsisäisen signaalireitin aktivaatioon: Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -, Wnt/planar polarity- ja Wnt/ $\beta$ -kateniini-signaalireitin (Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - ja Wnt/planar polarity- signaalireitit ovat ns. ei-kanonisia signaalireittejä, joiden vaikutukset eivät välity  $\beta$ -kateniinin määrän ja lokalisoitumisen kautta (kuva 6).

### 2.7.1 Ei-kanoniset signaalireitit

Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  -signaalireitti aktivoi fosfolipaasi C:n (PLC) (Slusarski ym. 1997) ja fosfodiesteriäsiin (PDE) (Ahamuda ym. 2002) heterotrimeeristen G -proteiinien välityksellä (kuva 6). PLC:n ja PDE:n aktivoituminen johtaa solunsisäisen  $\text{Ca}^{2+}$  -tason nousuun, syklisen GMP:n tason alenemiseen ja proteiini kinaasi C:n aktivoitumiseen.

Proteiinikinaasi C vaikuttaa edelleen kohdegeenien luentaan useiden transkriptiotekijöiden välityksellä. (Wang & Malbon 2003).

Wnt/planar polarity -signaalireitti aktivoi Rho/Rac GTPaaseja, jotka aktivoivat edelleen Jun N-terminaalisen kinaasin (JNK) (kuva 2). JNK:n aktivoituminen johtaa solun tukirangan organisaation muutoksiin ja geenien luennan säätelyyn (Habas ym. 2003). Molekulaarisia mekanismeja, jotka säätelevät näiden kahden signaalireitin aktivoitumista, ei tunneta hyvin (Rulifson ym. 2000).

Viime aikainen tutkimus on liittänyt ei-kanonisen signaloinnin myös luun kehitykseen. Wnt5a-proteiinin havaittiin indusoivan osteoblastogeneesiä luuytimen mesenkymaalisista kantasoluista. Wnt5a-proteiini aktivoi ei-kanonisen signaalireitin, mutta ei aktivoinut kanonista signaalireittiä. (Takada ym. 2007).

### **2.7.2 Kanoninen signaalireitti**

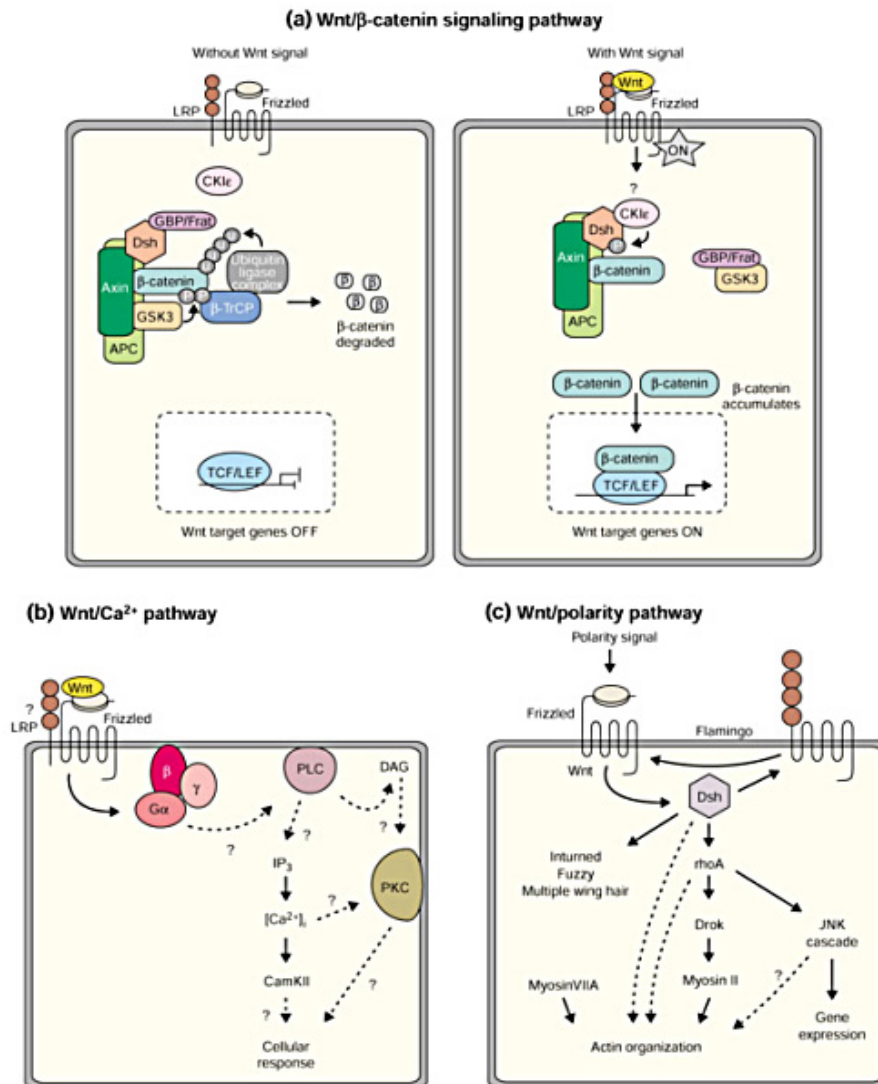
Wnt/ $\beta$ -kateniini- eli kanoninen signaalireitti on tunnetuin ja se edistää mm. proliferaatiota ja solun selviytymistä. Tässä työssä keskitytään kanoniseen signaalireittiin, koska sillä tiedetään olevan merkittävä rooli luun muodostumisen ja luun resorption kontrolloinnissa (Glass & Karsenty 2006). Häiriöt kanonisen signaalireitin toiminnassa johtavat kasvainten syntymisen ja kehittymisen ohella osteoporoosin syntyyn (Takayama ym. 2006). Lisäksi tiedetään, että kanoninen signaalireitti tehostaa osteoblastien proliferaatiota ja kypsien osteoblastien osteoprotegeriini eristystä, joka inhiboi luun resorptiota (Rawadi ym. 2003; Bennett ym. 2005).

Kanonisen signaalireitin vaikutukset välittyvät solunsisäisen  $\beta$ -kateniinin määrän ja lokalisaation kautta (kuva 6). Kun soluille ei ole tarjolla Wnt-proteiineja, pidetään  $\beta$ -kateniinin määrä solussa vakaana. Ne  $\beta$ -kateniini -molekyylit, jotka eivät osallistu kadheriinien liittämiseen solun tukirangan aktiiniin tai muihin solun toimintoihin, fosforyloidaan, ubikitinoidaan ja ohjataan proteosomaaliseen hajotukseen.  $\beta$ -kateniinin hajottamista välittää useiden proteiinien muodostama kompleksi, joka koostuu kinaaseista CKI ja GSK3 $\beta$  sekä ns. telineproteiineista Axin, APC ja Dsh. (Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Tämä kompleksi fosforyloi  $\beta$ -kateniinin N-terminaalisia



osia, luo kiinnittymiskohdan F-box/E2 ligaasi -kompleksille ja mahdollistaa  $\beta$ -kateniinin proteosomaalisen hajotuksen (Behrens ym. 1998; Jiang & Struhl 1998).

Kanoninen signaalireitti käynnistyy, kun Wnt-proteiini sitoutuu solun pinnalla sijaitsevaan reseptorikompleksiin, joka koostuu Lrp5/6- ja Fzd-transmembraaniproteiineista (Wehrli ym. 2000; Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Wnt-proteiinin sitoutuminen aiheuttaa toistaiseksi tuntemattomien kinaasien aktivoitumisen. Kinaasit fosforyloivat Lrp5/6- reseptorin solunsisäisiä osia, joihin Axin-proteiini pystyy kiinnittymään (Mao ym. 2001). Axin- proteiinin kiinnittyminen Lrp5/6-reseptoriin johtaa siihen, että GSK3 $\beta$  irtaava kompleksista ja sitoutuu alueelle mobilisoituneeseen GBP-proteiinin (GSK3 $\beta$  sitova proteiini). Tällöin  $\beta$ -kateniinia ei fosforyloida, se stabiloituu ja sitä pääsee kertymään solulimaan. Solulimaan kertynyt  $\beta$ -kateniini translokalisoituu tumaan, jossa se sitoutuu Lef1/Tcf- transkriptiotekijöihin syrjäyttäen korepressorit. (Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Korepressoreina toimivat mm. Groucho-proteiiniperheen jäsenet, jotka estävät Tcf-transkriptiotekijöitä muodostamasta transkriptiokompleksia.  $\beta$ -kateniinin sitoutuminen Lef1/Tcf-transkriptiotekijöihin houkuttelee paikalle transkriptionaalisia koaktivaattoreita, jotka stimuloivat useiden geenien, kuten *c-myc* (solun selviytyminen) ja *sykliini D1* (solusykli), luentaa (Hecht ym. 2000; Sun ym. 2000; Takahashi-Yanaga & Sasaguri 2007). Kanoninen signaalireitti voi lisäksi vaihentaa geenien luentaa, mutta vaihtamisen mekanismeja ei toistaiseksi tunneta yhtä hyvin. Signaalireitti vaihentaa mm. OCN- ja E-kadheriini- geenä (Westendorf ym. 2004).



Kuva 6. Wnt- signaalireitit. Kuvassa ylhäällä on kuvattuna kanoninen signaalireitti. Vasemmalla ylhäällä on tilanne, jossa soluille ei ole tarjolla kanonisen signaalireitin käynnistäviä Wnt-proteiineja. Oikealla on tilanne, jossa Wnt-proteiini sitoutuu Lrp/Fzd –reseptorikompleksiin ja käynnistää kanonisen signaalireitin. Alhaalla vasemmalla on kuvattuna Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  -signaalireitti, joka aktivoi kohdegeenien luentaa mm. proteiini kinaasi C: n välityksellä. Ja alhaalla oikealla on Wnt/planar polarity –signaalireitti, joka aktivoi mm. Jun N-terminaalisen kinaasin. (Miller, 2001).

$\beta$ -kateniini tunnetaan myös kadheriiniin assosioituneena proteiinina, koska se osallistuu kadheriinin liittämiseen solun tukirangan aktiiniin. Lisäksi  $\beta$ -kateniini on välttämätön solun adheesiolle ja migraatiolle sekä osallistuu solujen proliferaation ja selviytymisen modulointiin. Luusolulinjoissa  $\beta$ -kateniini havaittiin ensimmäisen kerran solu-solukontakteissa kadheriinin kanssa (Cheng ym. 1998).  $\beta$ -kateniinia ilmennetään yleisesti osteoblasteissa, mutta ei välttämättä osteosyyteissä.  $\beta$ -kateniini aktiivisuus on välttämätön mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumiseksi osteoblasteiksi ja toisaalta kypsien osteoblastien erilaistumiselle (Day ym. 2005).

## 2.8 Wnt-signaloinnin kohdegeenit

Wnt (Lef/Tcf) -kohdegeenejä tunnetaan jo useita (Nusse 2008, Verkkodokumentti). Huomattava osa kohdegeeneistä ilmentää proteiineja, jotka vaikuttavat solujen proliferaatioon. Näitä proteiineja ovat esimerkiksi c-myc, c-jun ja sykliini D1. Lisäksi kohdegeenit ilmentävät apoptoottisia säätelijöitä ja erilaistumisen kannalta merkittäviä tekijöitä, kuten FGF2, PPAR-d, BMP-4 ja c-Ret. Kohdegeenejä ovat myös solun migraatioon liittyvät *uPA*, *MMP-7* ja *CD-44* sekä mahdollisesti karsinogeneesiin osallistuvat geenit *endoteeli-1* ja *COX-2*. (Mann ym. 1999; Tetsu & McCormick 1999; Zhang ym. 2001).

Luussa esiintyviä kohdegeenejä ovat esimerkiksi *RANKL* ja *CCN1/Cyr61* (Nusse 2008, Verkkodokumentti). RANK-ligandilla on merkittävä rooli osteoklastogeneesissä. Sen sitoutuminen reseptoriinsa käynnistää osteoklastien kantasolujen fuusioitumisen ja erilaistumisen kypsiksi osteoklasteiksi. (Spencer ym. 2006). *CCN1/Cyr61* kuuluu CCN-geeniperheeseen. CCN- proteiinien toimintamekanismeja ei vielä täysin tunneta, mutta niiden uskotaan osallistuvan solujen proliferaatioon, migraatioon, erilaistumiseen, angiogeneesiin ja ennen kaikkea luuston kehittymiseen. *CCN1/Cyr61* -geenin aktivaation uskotaan vaikuttavan mesenkymaalisten solujen osteogeeniseen erilaistumiseen. (Si ym. 2006).

## 2.9 Wnt-antagonistit

Nisäkkäiden Wnt-proteiinien antagonistit voidaan jakaa viiteen luokkaan: Dickkopf (Dkk), erittävät frizzled-sukuiset proteiinit (Sfrp), Cerberus, Wnt: tä inhiboiva tekijä -1 (Wif-1) ja Wise. Antagonistit inhiboivat Wnt-signaalia sitoutumalla ligandiin ja/tai reseptoriin. Sfrp-, Cerberus- ja Wif-1- proteiinit sitoutuvat Wnt-proteiineihin ja/tai Fzd-reseptoreihin. Vastaavasti Dkk- ja Wise-proteiinit sitoutuvat Lrp5/6-reseptoriin ja/tai Krms1/2-reseptoriin. (Westendorf ym. 2004).

Nisäkässolut tuottavat neljää erilaista Dkk-proteiinia (Dkk1-4). Dkk1, Dkk2 ja Dkk4 inhiboivat Wnt-signaalia sitoutumalla Lrp5/6-reseptoriin ja Krms1/2-reseptoriin. Muodostunut Dkk-Lrp-Krm kompleksi poistetaan solukalvolta endosytoosilla, jolloin Wnt- riippuvaisten geenien luenta estyy. (Mao ym. 2002). Dkk3 ei sitoudu Lrp6- tai

Krm1/2-reseptoreihin ja sen vaikutuksia Wnt-signalointiin ei toistaiseksi tunneta hyvin (Nakamura ym. 2007). Sfrp-proteiineja on viisi erilaista ja ne sisältävät samanlaisen CRD- alueen kuin Fzd-reseptorit. Sfrp-proteiinit sitoutuvat Wnt-proteiineihin, mikä viittaisi siihen, että ne pystyvät säätelemään eri Wnt-signaalireittejä. (Kawano & Kypta 2003; Satoh ym. 2008). Cerperus-, Wise- ja Wif-1 -antagonisteista tiedetään toistaiseksi vähemmän. Cerberus- ja Wise-antagonisteja on tutkittu lähinnä *Xenopus*-malleilla (Piccolo ym. 1999; Itasaki ym. 2003). Wif-1 antagonistista tiedetään, että BMP-2 stimuloitujen osteoblastien tuottavat sitä ja se saattaa osallistua luun muodostumisen säätelyyn. Lisäksi tiedetään, että Wif-1 sitoutuu Wnt-proteiineihin WIF- domeenin välityksellä, mutta sitoutumisen mekanismia ja sen vaikutuksia ei toistaiseksi tunneta (Malinauskas 2008).

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välisen vuoropuhelun molekulaarista mekanismia ihmisen osteoblastisissa soluissa. Steroidien osalta työssä keskityttiin glukokortikoideihin ja kalsitrioliin.

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Solukokeet

#### 4.1.1 U2-Os -solujen kasvatus ja jakaminen

Adherentteja ihmisen U2-Os -osteosarkoomasoluja kasvatettiin Dulbecco's modified Eagle's kasvatusliuoksessa (DMEM, Gibco), johon oli lisätty 7 % naudan sikiön seerumi (FBS), 100 U/ml penisilliini, 0,1 mg/ml streptomysiini ja 2 mM L-glutamiini. Viljelmiä ylläpidettiin inkubaattorissa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa ja + 37 °C:ssa. Solut jaettiin kerran viikossa. Maljoilta poistettiin kasvatusmedium ja solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS). Maljoille pipetoitiin 0,05 % trypsiini-PBS-EDTA-liuosta, ja solujen annettiin irrota inkubaattorissa 5 minuuttia. Irronneet solut kerättiin maljoilta sopivalla kasvatusmediumtilavuudella. Solujen kunto ja määrä määritettiin sekoittamalla solususpensiosta otettuun näytteeseen 1:1 0,1 % erytrosiini B -väriä. Värjäyksen tarkoituksena on erottaa hyväkuntoiset solut kuolleista. Seosta pipetoitiin Bürker-laskukammioon ja solujen lukumäärä laskettiin valomikroskoopin avulla. Solutiheyden perusteella solut jaettiin kokeesta riippuen sopivassa tiheydessä maljoille ja kuoppalevyille. Ylläpitomaljoille vaihdettiin tuore kasvatusliuos 4 päivän kuluttua solujaosta.

#### 4.1.2 Tutkittavat yhdisteet

Solukokeissa käytettiin vaikuttavina aineina 35 mM litiumkloridia (LiCl), 100 nM deksametasonia (Dex), 10 nM 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 10 µM Mifepristonea (RU38486) ja 20 µM TZDZ8. LiCl ja TZDZ8 ovat GSK3β-inhibiittoreita (Meijer ym. 2004) ja niitä käytettiin Wnt-signaalireitin aktivoimiseen. Dex on synteettinen kortisoli, jolla tutkittiin glukokortikoidien vaikutuksia ja 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on kalsitrioli eli D<sub>3</sub>-vitamiinin aktiivisin muoto. Mifepristone on antihormoni, joka toimii mm. GR antagonistina (Kauppi ym. 2003). Kontrolliryhmän soluille lisättiin sitä liuotinta, johon vaikuttava aine oli liuotettu.

## 4.2 Transfektiokokeet

### 4.2.1 Transfektiossa käytetyt raportoija-konstruktit ja ekspressiovektorit

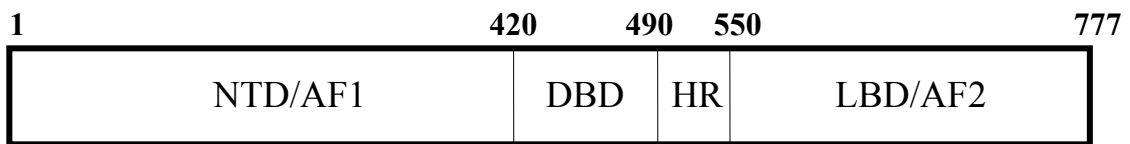
Wnt-signaalintireitin aktivoitumista tutkittiin TOPflash -raportoijakonstruktiin (TCF Reporter Plasmid, Upstate) avulla. TOPflash -raportoijakonstruktin sisältää kaksi vastakkaisuuntaisesti orientoitunutta kolmen kopion Tcf-sitoutumiskohtaa. Sitoutumiskohdat sijaitsevat ylävirtaan tymidiini kinaasi promoottorista (TK) ja lusiferaasi-lukukehyksestä. Negatiivisena kontrollina käytettiin FOPflash-raportoijakonstruktiota (TCF Reporter Plasmid, Upstate), joka sisältää yhden mutatoituneen Tcf-sitoutumiskohdan. Wnt-signaalireitti aktivoitiin LiCl:lla sekä kotransfektoimalla villityypin  $\beta$ -kateniinia tai stabiilia  $S^{33}$ -kateniinia pcDNA3.1/Zeo -ekspressiovektorissa (H.C. Clevers, Hubrecht Laboratory, Hollanti).

GR:n yliekspressiossa käytettiin kokeesta riippuen pSG5-hGR konstruktiota (Jorma Palvimo, Kuopion yliopisto) tai pMT-hGR -konstruktiota. Wnt-signaalireitin muuntelun kannalta merkittäviä GR:n osia kartoitettiin kotransfektoimalla mutatoituja GR:ta: pMT-hGR-DBD, pMT-hGR-Ax (Sam Okret, Karolinska Instituutti, Ruotsi) ja pMT-hGR-AF1. pMT-hGR-DBD käsittää aminohapot 1- 77 ja 262- 500, jotka muodostavat GR:n DBD-alueen. pMT-hGR-DBD: sta puuttuu GR:n LBD sekä AF-1-alue. pMT-hGR-Ax käsittää aminohapot 458- 777, joten siitä puuttuu reseptorin NTD-alue sekä suurin osa DBD-alueesta. pMT-hGR-AF1: sta vastaavasti puuttuu reseptorin AF-1-alue, joka sijaitsee NTD-alueella (kuva 7). Wnt-signaalintireitin vaikutuksia GR-signalointiin tutkittiin pGL3-MMTV-(-1146/+88)-Luc -raportoijakonstruktiin avulla (saatu Jorma Palvimo, Kuopion yliopisto). MMTV-raportoijakonstruktin sisältää useita GRE:jä, joihin GR pystyy sitoutumaan, sekä lusiferaasireportterigeenin ja MMTV- promoottorin. MMTV-raportoijakonstruktiin avulla tutkittiin lisäksi GR:n transkriptionaalista aktiivisuutta ja mutatoitujen GR:en kykyä aktivoida GRE.

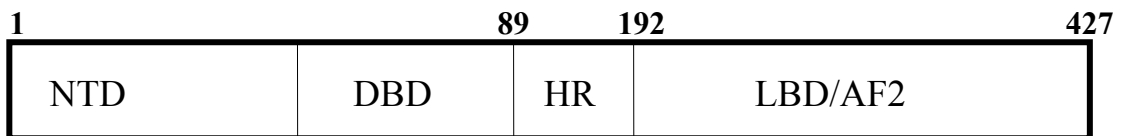
VDR:n yliekspressiossa käytettiin pSG5-hVDR- (Carsten Carlberg, Kuopion yliopisto) ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja (R.Evans, Salk Instituutti, San Diego). Wnt-signaalireitin muunteluun osallistuvia VDR:n osia tutkittiin käyttämällä pistemutatoituja muotoja: pSG5-hVDR-417A, pSG5-hVDR-420A ja pSG5-hVDR-264A (Sami Väisänen, Kuopion yliopisto) (kuva 7).

Wnt-signaalintireitin ja kalsitriolin vaikutuksia osteokalsiinigeenin ilmentymiseen tutkittiin OCN -promootorin sisältävän pXP1-hOC(-881/+29) -raportojakonstruktin avulla (Sanna Ryhänen, Kuopion yliopisto). Pistemutatoitujen VDR:den kykyä aktivoida VDRE tarkasteltiin (DR<sub>3</sub>)<sub>4</sub> -raportojakonstruktin (Carsten Carlberg, Kuopion yliopisto) avulla, joka sisältää neljä DR<sub>3</sub>-jaksoa. DR<sub>3</sub> on responsiivinen elementti, johon VDR pystyy sitoutumaan.

β-galaktosidaasimääritystä varten soluihin transfektoitiin pCMV-β-gal-vektoria (Clontech). Transfektiokoeksissa täytevektoreina käytettiin pSG5, pcDNA3.1 ja Flag-CMV2.



hGRα



hVDR

Kuva 7. hGR- ja hVDR -rakenne. Tutkimuksissa käytettiin mutatoituja GR:ta: pMT-hGR-DBD, pMT-hGR-Ax ja pMT-hGR-AF1. pMT-hGR-DBD käsittää aminohapot 1- 77 ja 262- 500 ja pMT-hGR-Ax käsittää aminohapot 458- 777. pMT-hGR-AF1 puuttuu AF-1-alue, joka sijaitsee reseptorin NTD:lla. VDR:sta käytettiin pistemutatoituja muotoja: E420A, K264A ja L417A. Nämä aminohapot sijaisivat reseptorin LBD:lla, jossa on myös VDR:n AF-2 -alue.

#### 4.2.2 Transfektio *TransIT*<sup>®</sup> LT1 -lipofektio- ja FuGENE<sup>®</sup> HD-transfektioagenssilla

Transfektioissa käytettiin lipofektioagenssia *TransIT*<sup>®</sup> LT1 (Mirus Bio Corporation) ja FuGENE<sup>®</sup> HD- transfektioagenssia (Roche Applied Science). Transfektiota varten solut jaettiin 24-kuoppalevyille (60 000 solua/kuoppa) kasvatusliuoksessa. Seuraavana päivänä soluille vaihdettiin transfektio-liuos (2 % aktiivihäiläsuodatettu FBS, 2 mM L-glutamiini- DMEM). Liuoksen vaihdosta noin 4 tunnin kuluttua suoritettiin transfektio.

Transfektiossa käytetyt DNA-konstruktit sekoitettiin nopeasti ja sentrifugoitiin pohjaan. Huoneenlämpöinen *TransIT*<sup>®</sup> LT1 -agenssi sekoitettiin nopeasti ja laimennettiin 3 %:ksi lämpöiseen seerumittomaan DMEM:iin. Laimennosta inkuboitui

huoneenlämmössä 5 minuuttia, jonka jälkeen sitä lisättiin DNA- määrästä riippuva tilavuus. Putkia inkuboitin huoneenlämmössä 15- 20 minuuttia, jonka jälkeen seos lisättiin soluille pisaroittain. FuGENE® HD- transfektioagenssilla transfektoitaessa konstrakteista valmistettiin reaktioseokset, joihin lisättiin lämpimähköä DMEM: iä niin, että lopullinen DMEM -tilavuus oli 100 µl 2 µg:a DNA:ta kohden. Huoneenlämpöinen FuGENE® HD -agenssi sekoitettiin nopeasti vorteksoimalla ja reagenssia lisättiin DNA-DMEM -liuokseen kolminkertainen määrä suhteessa DNA:n kokonaismäärään. Liuosta inkuboitin 15 minuuttia huoneenlämmössä. Soluille lisättiin liuosta pisaroittain DNA:n määrästä riippuva tilavuus.

Solujen kunto tarkastettiin seuraava päivänä mikroskopoimalla. Noin 12- 16 tunnin kuluttua transfektioista soluille lisättiin DMEM:iin laimennettuna tutkittavat yhdisteet. Kontrollisoluille lisättiin vastaavasti liuotinta, johon tutkittava yhdiste oli liuotettu. 24 tunnin kuluttua vaikuttavien aineiden lisäyksestä solut lyysattiin. Solut pestiin kylmällä PBS: lla, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 30 µl 1 x lyysipuskuria (Reporter Lysis Buffer, Promega) ja levyt vietiin -70 °C: seen vähintään 30 minuutiksi. Levyt sulatettiin, lysaatit raaputettiin irti kuopista ja siirrettiin Eppendorf-putkiin. Lysaatteja sentrifugoitiin 5 minuuttia, 13 000 rpm +4 °C, jonka jälkeen suoritettiin lusiferaasi-, β-galaktosidaasi- ja proteiinipitoisuus- määritykset.

#### **4.2.3 Lusiferaasi-määritys**

Lusiferaasi-määritys suoritettiin Ascent Luminoscan -laitteella käyttäen Ascent Software-ohjelmistoa. Määrityksessä käytettiin LIA (luminescence immunoassay) 96-kuoppalevyä ja ohjelmiston mittausaika oli 1 sekunti kuoppaa kohden. Kuoppiin pipetoitiin taustakontrolliksi 10 µl 1 x lyysipuskuria sekä näytteitä 10 µl. Kuoppiin lisättiin 30 µl Luciferase Assay-reagenssia (Promega) ja levyä sekoiteltiin naputtamalla. Tämän jälkeen näytteiden lusiferaasiarvot mitattiin mahdollisimman nopeasti.

#### **4.2.4 β-galaktosidaasi-määritys**

Määritystä varten valmistettiin reaktiopuskuri: 100 x Mg-puskuri (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-merkaptopetanololi), ONPG (o-nitrofenyyli-β-galaktopyranosidi, 0.75 mg/ml 0.1 M Na-fosfaatissa, pH 7) ja 0.1 M Na-fosfaatti, pH 7.0. Optiselle 96-kuoppalevyille pipetoitiin



10 µl näytteitä ja taustakontrollia (1 x lyysipuskuri), jonka jälkeen lisättiin 65 µl reaktiopuskuria. Levyä sekoitettiin naputtamalla ja inkuboitiin huoneenlämmössä, kunnes keltainen väri oli selkeästi havaittavissa. Reaktion etenemistä seurattiin Multiskan EX -kuoppalevylukijalla (Thermo Labsystems). Kun absorbanssi-arvot olivat välillä 0,3- 0,4, pysäytettiin reaktio lisäämällä 125 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> -liuosta. Pysäytyksen jälkeen mitattiin absorbanssi aallonpituudella 405 nm.

#### **4.2.5 Proteiinipitoisuuden määrittäminen**

Näytteiden proteiinkonsentraatiot määritettiin spektrofotometrisesti Bradfordin – määrittelyyn perustuvalla menetelmällä. Optiselle 96-kuoppalevylle pipetoitiin 10 µl 1 x lyysipuskuria taustakontrolliksi ja näytteet, jotka oli laimennettu 1:5 1 x lyysipuskuriin. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 200 µl 1:5 veteen laimennettua proteiiniväriä (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories). Levyä seisoitettiin 5 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen absorbanssit mitattiin Multiskan EX -kuoppalevylukijalla (Thermo Labsystems) aallonpituudella 595 nm.

#### **4.3 Immunofluoresenssivärjäys**

Immunovärjäyskokeita varten solut jaettiin kasvatusmediumissa 4-kuoppalevylle (45 000- 60 000 solua/kuoppa), joissa oli pyöreät peitinlasit kuoppien pohjalla. Seuraavana päivänä kasvatusliuos vaihdettiin transfektioliuokseen ja neljän tunnin kuluttua liuoksen vaihdosta suoritettiin transfektio. Transfektiosta noin 16 tunnin kuluttua soluille lisättiin tutkittavat yhdisteet ja levyille otettiin 3 tunnin, 6 tunnin, 24 tunnin ja 48 tunnin aikapisteet kokeesta riippuen.

Liuos poistettiin ja solut pestiin kahdesti kylmällä PBS: lla. Pesujen jälkeen solut fiksattiin huoneenlämmössä 3 % paraformaldehydi-PBS-liuoksella 20 minuuttia. Solut pestiin uudelleen kylmällä PBS: lla fiksausliuoksen poistamiseksi. Tämän jälkeen solut permeabilisoitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia 0,1 % Triton X-100-PBS -liuoksella. Tausta blokattiin huoneenlämmössä 1- 2 tuntia 1 % BSA-PBS -liuoksella vasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Primaarisena vasta-aineena käytettiin beta-kateniinia (Santa Cruz Biotechnology Inc.) laimennettuna 1:75- 1:225 1 % BSA-PBS -liuoksella. Vasta-aineen annettiin vaikuttaa yön yli + 4 °C. Solut pestiin 4 x 5 minuuttia

kylmällä PBS: lla, jonka jälkeen peitinlasien päälle pipetoitiin sekundaarista FITC-leimattua vasta-ainetta (Vector Laboratories) laimennettuna 1:1000 1 % BSA-PBS-liuokseen. Vasta-ainetta inkuboitiin huoneenlämmössä, pimeässä 1 tunti. Solut pestiin uudelleen 4 x 5 minuuttia kylmällä PBS: lla. Pesujen jälkeen peitinlasit käytettiin pikaisesti steriilissä vedessä ja pedattiin objektiivilaseille, joihin oli pipetoitu pisara Vectashield mounting mediumia (Vector Laboratories). Tämän jälkeen näytteet olivat valmiita tarkasteltaviksi konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK).

#### **4.4 Kvantitatiivinen PCR**

OCN on osteoblastien tuottama proteiini, jonka uskotaan osallistuvan mm. osteoblastien aktiivisuuden ja luun muodostuksen säätelyyn. Wnt-signaalireitin tiedetään vaimentavan OCN-geenin luentaa. Tässä työssä määritettiin OCN -geenin ilmentymistasoja U2-Os-soluissa, kun soluja käsiteltiin kalsitriolilla sekä Wnt-signaalointia aktivoivilla tekijöillä. Työssä käytettiin SYBR Green -kemialla, joka perustuu fluoresoivan leiman sitoutumiseen kaksijuosteiseen tuotteeseen. Mitä enemmän tuotetta monistuu, sitä enemmän PCR: ssa detektoidaan fluoresoivaa SYBR Green -leimaa. Sisäisenä kontrollina käytettiin GAPDH (glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi) -geeniä, jota ilmentetään kaikissa soluissa. Tutkittavat yhdisteet eivät vaikuta GAPDH:n ilmentymistasoihin.

##### **4.4.1 Kokonais-RNA:n eristys**

Solut jaettiin Ø 6 cm maljoille (500 000 solua/malja). Seuraavana päivänä solut pestiin PBS: lla ja soluille vaihdettiin kasvatusliuos. Maljoille lisättiin tutkittavat aineet ja solut kerättiin 3 tunnin ja 24 tunnin aikapisteissä. Maljoilta poistettiin kasvatusliuos, solut pestiin kylmällä PBS:lla ja kerättiin Eppendorf -putkiin. Putkia sentrifugoitiin 30 sekuntia 13 200 rpm + 4 °C ja supernatantti poistettiin. Pelletit käytettiin nestetypessä, jonka jälkeen ne pakastettiin -70 °C.

Soluista eristettiin RNA käyttäen E.Z.N.A Total RNA Isolation Kittä ja RNase-Free DNase I Settiä (Omega bio-tek). Solujen lyysaus ja RNA:n eristys suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. RNA:n eristys perustuu silikapohjaisen HiBind®-

matriksin sitomisominaisuuksiin. Kitillä saadaan eristettyä 200 nukleotidia pidemmät RNA-molekyylit. Solut lyysattiin TRK lyysipuskurilla, johon oli lisätty  $\beta$ -merkaptetoetanolia. Lysaatit homogenisoitiin neulan (22G) ja ruiskun avulla. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 70 % etanolia, joka tehosti RNA:n sitoutumista HiBind® RNA spin-kolonneihin. Kolonneihin sitoutunutta RNA:ta pestiin RNA pesupuskurilla, jonka jälkeen genominen DNA poistettiin DNAasi käsittelyllä. Epäpuhtaudet pestiin pois ja RNA eluoiitiin pylvästä RNAasi-vapaalla DEPC -vedellä. Eristetyn RNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin spektrofotometrillä aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm 1:25 laimennoksesta TE-puskuriin.

#### 4.4.2 cDNA-synteesi

cDNA-synteesissä käytettiin ribonukleaasi H-aktiivisuuden omaavaa M-MuLV Reverse Transcriptase -käänteistranskriptaasia (Fermentas). Ribonukleaasi H aktiivisuutensa vuoksi entsyymi pystyy pilkkomaan RNA:ta synteesissä muodostuvista RNA-DNA hybrideistä. Synteesissä käytettiin oligo (dT)-alukkeita, jotka hybridisoituivat näytteen mRNA-molekyylien poly-A-häntään.

cDNA-synteesiin otettiin kokonais-RNA:ta 0,5- 1  $\mu$ g. Lisäksi tehtiin reagenssikontrolli, jossa oli RNA:n tilalla vastaava vesitilavuus sekä DNAasi-kontrolli, johon lisättiin MuLV-entsyymien sijasta vettä. Valmistettiin seuraava reaktioseos: 1 x MuLV-reaktiopuskuri (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 1 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP ja dTTP) ja 20 pmol Oligo (dT)<sub>16</sub>-aluke. Reaktioseos lisättiin näyte- ja kontrolliputkiin. Näytteitä inkuboitii PCR-laitteessa (Biometra®, T3 Thermocycler) 5 minuuttia +65 °C: ssa. Inkubaation aikana mahdolliset RNA:n sekundäärirakenteet hajoavat. Tämän jälkeen lämpötila laskettiin +37 °C: een ja putkiin lisättiin MuLV-entsyymi (10 U/reaktio). Synteesiä jatkettiin 60 minuuttia + 37 °C: ssa, jonka jälkeen reaktio pysäytettiin inaktivoimalla MuLV-entsyymi + 70 °C: ssa 8 minuuttia ja lopuksi lämpötila laskettiin +4 °C: een. Käännetyt cDNA:t säilytettiin +4 °C: ssa.

#### 4.4.3 Kvantitatiivinen-PCR -ajo

Kvantitatiivisessa PCR –ajossa käytettiin alukepareina OCN- (OCN f ja OCN r) ja GAPDH- alukkeita (A160 ja A161). OCN- alukkeista monistuvan tuotteen koko on 203 emäsparia (Celeste 1986) ja GAPDH- alukkeista monistuvan tuotteen koko on 501 emäsparia (Ryhänen 1997).

Valmistettiin seuraava reaktioseos: 1:10 000 Sybr Green I –väri (Molecular Probes), 1 x puskuri (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0,8 % Nonidet P40), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTP, 10 pmol OCN f- ja OCN r- alukkeet tai 5 pmol A160- ja A161- alukkeet, 1,5U Taq polymeraasi ja steriili H<sub>2</sub>O. Reaktioseosta pipetoitiin 15 µl Thermo-Fast® 96-kuoppalevyille (Abgene), jonka jälkeen lisättiin 5 µl 1:5 veteen laimennettua cDNA:ta. Levyt kuumasiilattiin kiinni ja sentrifugoitiin nopeasti.

Kvantitatiivinen PCR-ajo suoritettiin Stratagene MX3000 -laitteistolla. PCR-ajovaiheet olivat: alkudenaturaatio (95 °C, 10 minuuttia), 40 reaktiosykliä (denaturaatio 95 °C, 30 sekuntia; sitoutuminen 55 °C 1 minuutti; pidennys 72 °C 30 sekuntia) ja loppupidennys 72 °C:ssa 5 minuuttia. Laitteisto muodosti PCR-ajosta dissosiaatiokäyrän, jonka avulla tarkasteltiin monistuvan tuotteen puhtautta ja ajon onnistumista.

Ajotuloksia tarkasteltiin  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$  -kaavalla.  $\Delta\Delta C_t$  on  $\Delta C_{t(\text{käsittely})} - \Delta C_{t(\text{kontrolli})}$  ja  $\Delta C_t$  vastaavasti on  $C_{t(\text{OCN})} - C_{t(\text{GAPDH})}$ . Kaavassa  $C_t$  (cycle threshold) on se syklien määrä, jossa näytteen intensiteetti saavuttaa threshold linen. Threshold line on vastaavasti se taso, jossa fluoresenssin intensiteetti ylittää taustan fluoresenssitason.

## 5 TULOKSET

### 5.1 Raporttoijakokeiden analysointi

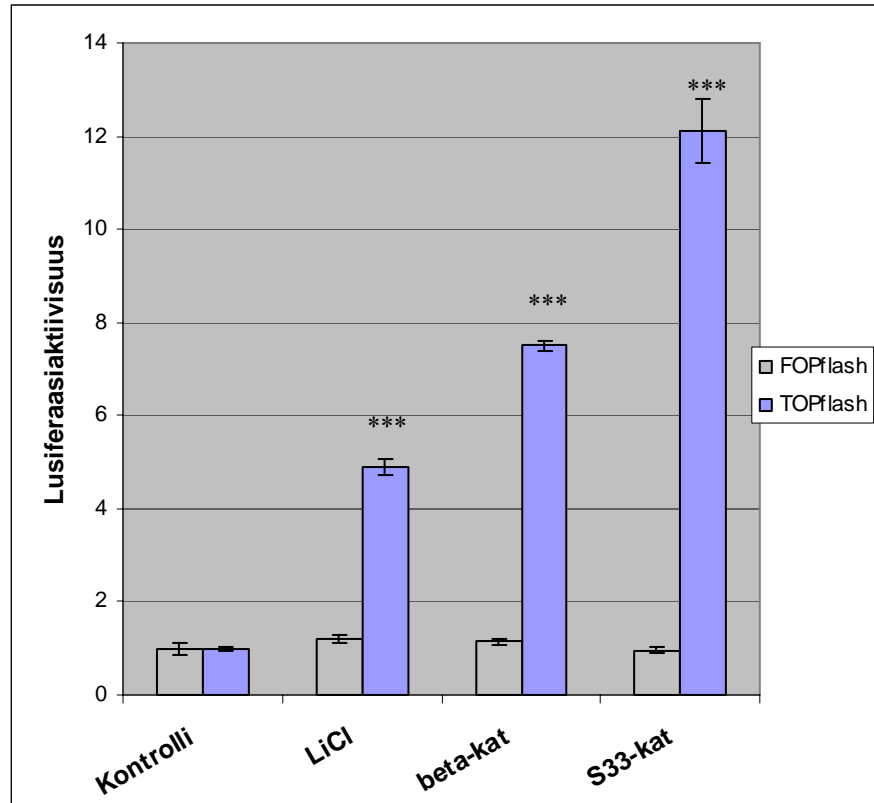
Kaikissa transfektiokokeissa oli rinnakkaisia näytteitä kolme kappaletta ja jokainen koe suoritettiin vähintään kahdesti. Transfektiokokeiden tulokset analysoitiin Microsoft Excel XP-ohjelman avulla. Näytteiden lusiferaasi-,  $\beta$ -galaktosidaasi- ja kokonaisproteiinituloksista poistettiin taustan vaikutus vähentämällä nollanäytteiden antamien vastaavien arvojen keskiarvo. Tulokset normalisoitiin jakamalla näytteiden lusiferaasitulokset sekä  $\beta$ -galaktosidaasi- että kokonaisproteiinituloksilla. Normalisoiduille arvoille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat. Normalisoitujen keskiarvojen avulla laskettiin kertaluokan kertoimet, jotka ilmoittivat käsittelyn aiheuttaman muutoksen soluissa suhteessa kontrollisoluihin (käsittely/kontrolli). Kertaluokan kertoimien ja kontrolliin suhteutettujen hajontojen perusteella piirrettiin kuvaaja. Tilastolliset analyysit suoritettiin Microsoft Excel XP-ohjelmalla käyttäen Student's *t*-testiä.

Tuloksissa on esitetty vain kokonaisproteiinituloksiin normalisoidut lusiferaasitulokset. Tämä johtuu siitä, että eräät käsittelyt vaikuttivat  $\beta$ -galaktosidaasituloksiin, joten kokonaisproteiiniin normalisoituja lusiferaasituloksia pidettiin luotettavampana.  $\beta$ -galaktosidaasitulosten perusteella voitiin kuitenkin tarkastella transfektiotehokkuutta.  $\beta$ -galaktosidaasia ilmennettiin lähes samalla tasolla kokeesta toiseen, joten transfektiotehokkuus säilyi rinnakkaisissa kokeissa (tulokset ei näkyvissä). Tuloksissa on ilmoitettu raporttoijakonstruktion aktivoituminen muodossa  $ka \pm sd$ .

### 5.2 Wnt-signalointireitin toiminta ja aktivaatio ihmisen osteoblastissa U2-Os-soluissa

Wnt-signalointireitin aktivoitumista ja perusaktiivisuuden tasoa ihmisen osteoblastisissa U2-Os -soluissa tutkittiin käyttämällä TOPflash-raporttoijakonstruktiota, joka sisältää Tcf-sitoutumiskohdan. Wnt-signalointireitti pystytään aktivoimaan LiCl:lla ja TZDZ8:lla, jotka ovat GSK3-inhibiittoreita. Wnt-signalointireitin aktivoituminen U2-Os -soluissa oli tehokkaampaa LiCl:lla kuin TZDZ8:lla (tulokset ei näkyvissä), joten LiCl valittiin jatkokokeisiin. Lisäksi Wnt-signalointireitti pystytään aktivoimaan  $\beta$ -kateniinin

yliekspressiolla. Negatiivisena kontrollina käytettiin FOPflash-raportoijakonstruktiota, joka sisältää mutatoituja Tcf- sitoutumiskohtia. Kuvassa 7 on esitetty Wnt-signalointireitin aktivoituminen U2-Os -soluissa.



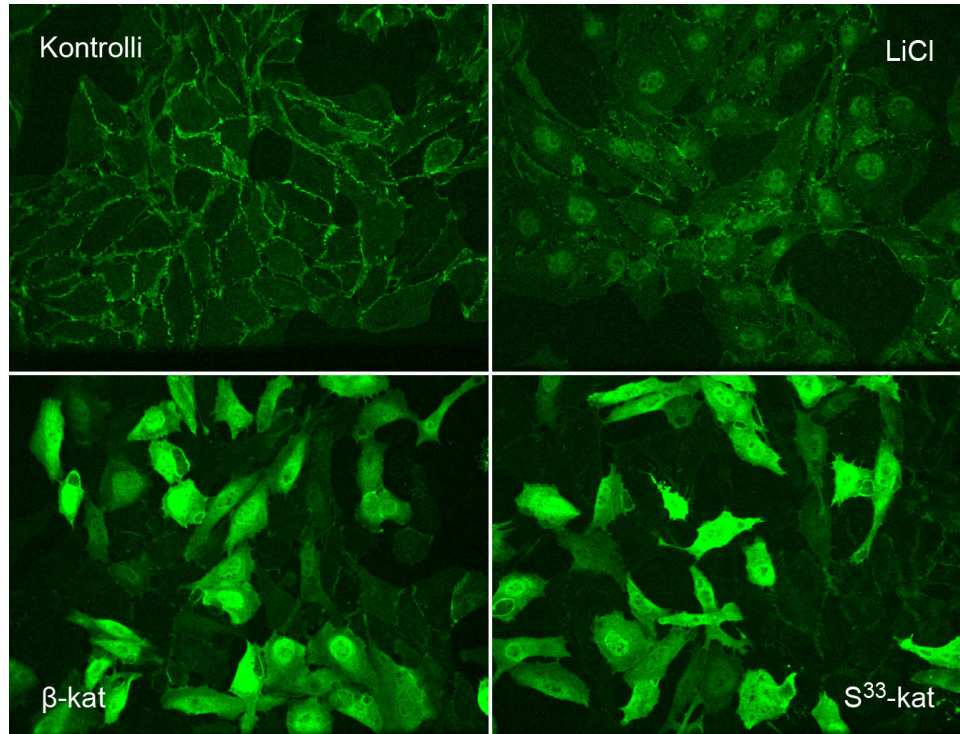
Kuva 7. Wnt-signalointireitin aktivoituminen U2-Os -soluissa. Wnt-signalointireitin aktivoitumista tutkittiin TOPflash-raportoijakonstruktiolla ja reitti aktivoitiin LiCl:llä ja  $\beta$ -kateniinin yliekspressiolla. Negatiivisena kontrollina käytettiin FOPflash-raportoijakonstruktiota. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05.

LiCl aktivoi TOPflash-raportoijakonstruktiota  $9 \pm 4$  -kertaisesti suhteessa kontrollitasoon (kuva 7, kuva 10). Villityypin  $\beta$ -kateniinin yliekspressio aktivoi  $16 \pm 3$ - ja stabiilin S<sup>33</sup>-kateniinin yliekspressio  $19 \pm 6$  -kertaisesti suhteessa kontrollitasoon nähden (kuva 11). Kuvissa on esitetty esimerkkinä yhden raportoijakokeen tulokset. Ekspressiotasoja kontrolloitiin  $\beta$ -galaktosidaasi-määrityksellä (tulokset ei näkyvissä). TOPflash-raportoijakonstruktiin aktivointiin käytetyt menetelmät eivät aktivoineet FOPflash-raportoijakonstruktiota. Tämä viittaisi siihen, että menetelmät ovat spesifisiä ja aktivoivat juuri Wnt-signalointireittiä.

Odotetusti Wnt-signalointireitin aktivoituminen on tehokkainta stabiilin  $S^{33}$ -kateniinin yliekspressiolla. Aktivoituminen on tehokkaampaa  $S^{33}$ -kateniinilla kuin villityypin  $\beta$ -kateniinilla, koska solu ei pysty hajottamaan  $S^{33}$ -kateniinia.

Wnt-signalointireitin aktivoitumista tarkasteltiin lisäksi immunovärjäyskokeiden avulla. Immunovärjäyskokeilla tutkittiin  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumista soluissa. Kun soluille ei ole tarjolla Wnt-proteiineja, pidetään  $\beta$ -kateniinin määrä solussa vakaana. Ne  $\beta$ -kateniini-molekyylit, jotka eivät osallistu solun toimintoihin fosforyloidaan, ubiquitinoidaan ja hajotetaan proteosomaalisesti. Kontrollisoluissa solukalvot sekä solu-solukontaktit värjäytyvät voimakkaasti, koska  $\beta$ -kateniini-molekyylit osallistuvat kadheriinien liittämiseen solun tukirangan aktiiniin (kuva 8).

Kun Wnt-signalointireitti aktivoidaan LiCl:lla., pääsee  $\beta$ -kateniinia kertymään soluun. Soluun kertynyt  $\beta$ -kateniini translokalisoituu tumaan, jossa se vaikuttaa geenien luentaan. Translokalisaatio havaitaan selvästi myös soluissa, joihin on yliekspressoitu villityypin  $\beta$ -kateniinia tai stabiilia  $S^{33}$ -kateniinia (kuva 8).

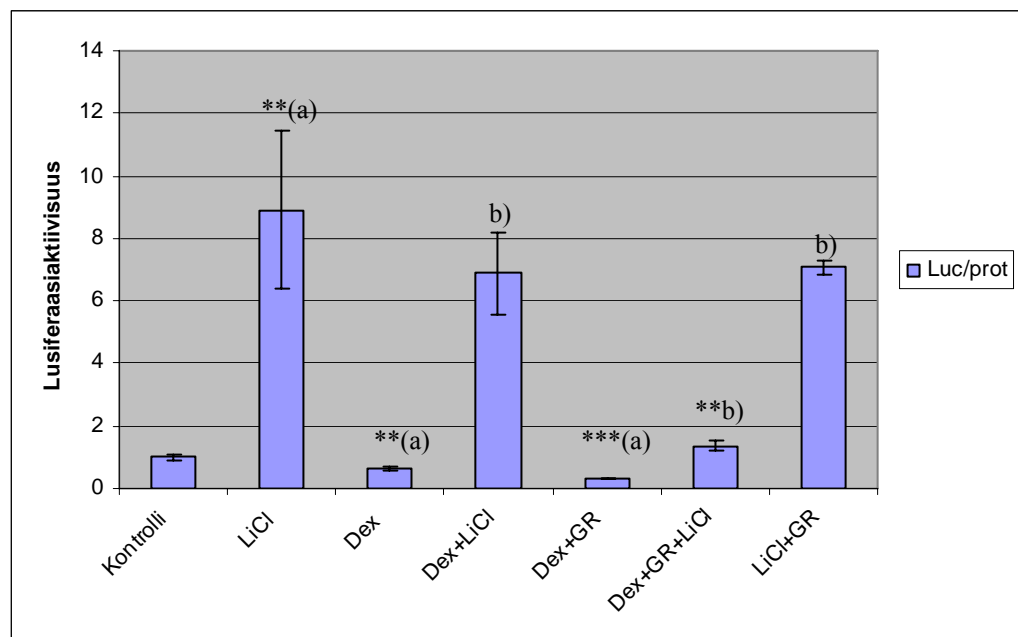


Kuva 8.  $\beta$ -kateniinin lokalisoituminen Wnt-signalointireittiä aktivoitaessa. Wnt-signalointireitti aktivoitiin LiCl:lla tai  $\beta$ -kateniinin yliekspressiolla. Primääri vasta-aineena käytettiin beta-kateniinia (Santa Cruz) ja sekundääri vasta-aineena anti-hiiri-FITC (Vector). Näytteet tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK). Objektiivin suurennus 20x.

### 5.3 Glukokortikoidit ja kalsitrioli heikentävät Wnt-signalointia U2-Os-soluissa

Glukokortikoidien vaikutuksia tutkittiin Dex:lla, joka on synteettinen kortisolijohdannainen. Tutkimusryhmän aikaisempien tutkimusten perusteella tiedettiin, että glukokortikoidit kykenevät vaientamaan kanonista Wnt-signalointireittiä ihmisen osteoblasteissa. D-vitamiinin vaikutuksia tutkittiin kalsitriolilla, joka on D<sub>3</sub>-vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto.

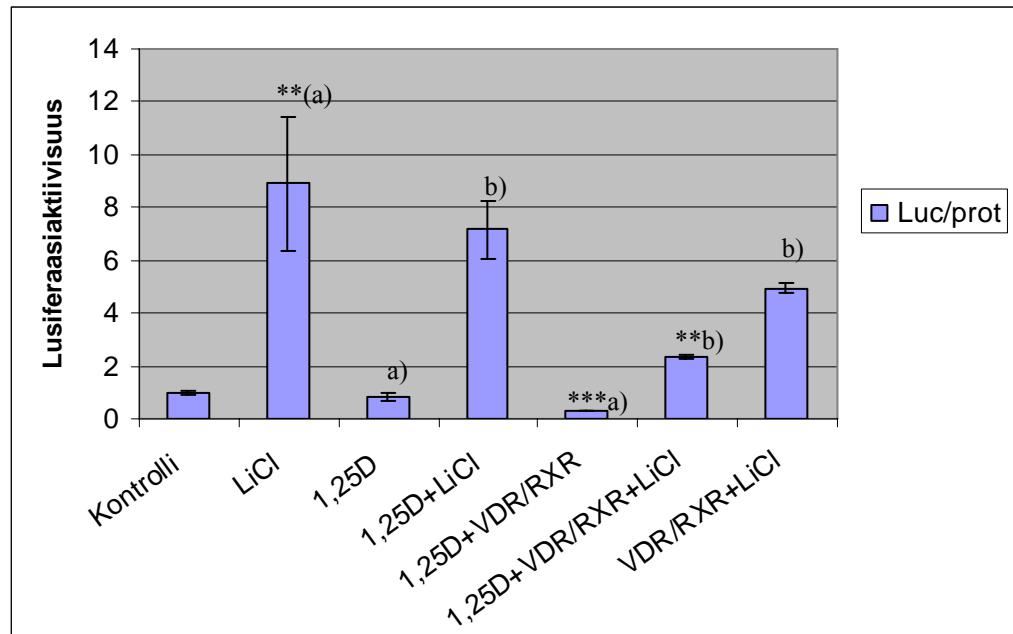
TOPflash-raportoijakokeiden mukaan havaittiin, että Dex vaimensi Wnt-signalointireittiä noin 35 % verrattuna perustasoon (kuva 9). Glukokortikoidit kykenivät moduloimaan LiCl:lla aktivoitua TOPflash-raportoija aktiivisuutta. Glukokortikoidivaikutuksen aikaansaaminen edellytti GR:n yliekspressiota soluissa, koska U2-Os -soluissa ei ole endogeenistä GR:a (Rogatsky ym. 1997). Ilman ligandia GR ei vaimentanut Wnt-signalointireittiä.



Kuva 9. Glukokortikoidien vaikutus LiCl-aktivoituun Wnt-signalointireittiin. Soluihin transfektoitiin TOPflash-raportoijakonstruktiota sekä pSG5-hGR-konstruktiota. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo ± keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\*p<0,01 ja \*p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b) LiCl-indusoituun tasoon verrattuna.

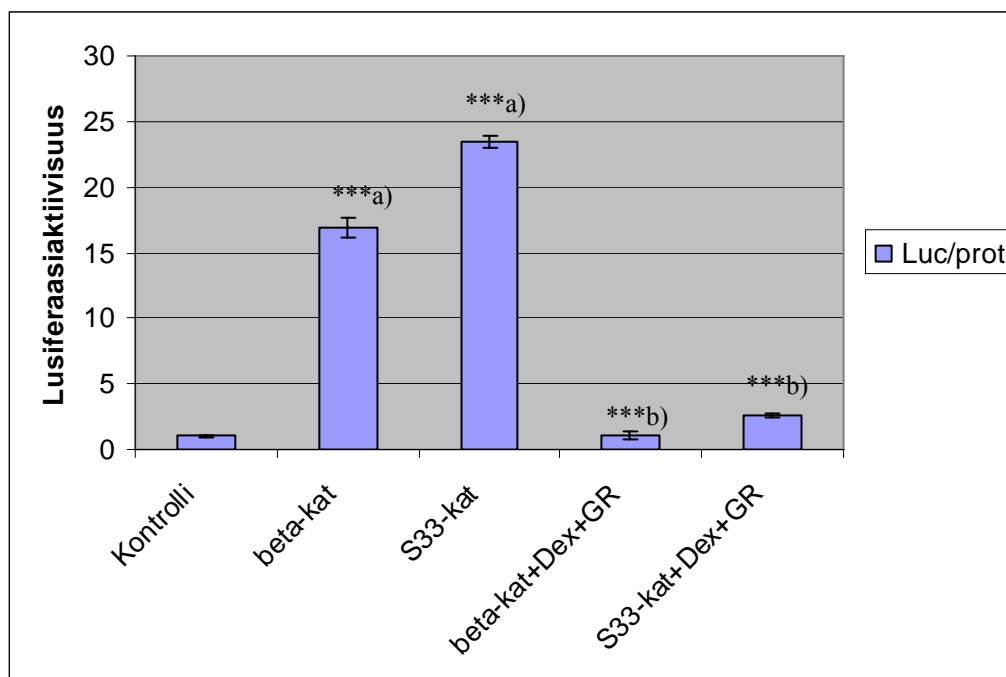


Lisäksi TOPflash-raporttoijakokeista havaittiin, että kalsitrioli vaimensi Wnt-signalointireittiä noin 20 % suhteessa perustasoon (kuva 10). Vaimeneminen oli heikompaa kuin glukokortikoideilla. Kalsitrioli vaimensi LiCl-aktivoitua Wnt-signalointia, kun käytettiin ligandin lisäksi reseptorien VDR/RXR yliekspressiota. Koska kalsitriolin vaikutukset ilman reseptoria olivat vähäiset, viittaisi tämä siihen, että U2-Os- soluissa ei ole merkittävästi endogeenistä VDR:a.

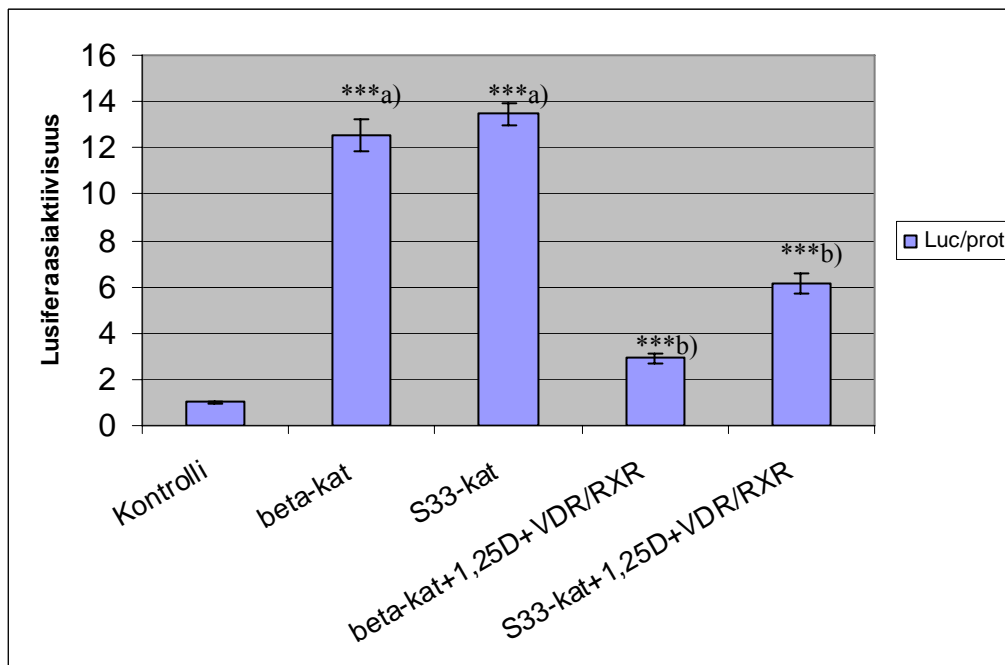


Kuva 10. Kalsitriolin vaikutus LiCl -aktivoituun Wnt-signalointiin. Soluihin transfektoitiin TOPflash-raporttoijakonstruktiota sekä pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b) LiCl-indusoituun tasoon verrattuna.

Glukokortikoidit ja kalsitrioli kykenivät moduloimaan myös  $\beta$ -kateniiniaktivoitua TOPflash-raporttoijaa aktiivisuutta (kuva 11, kuva 12). Vaikutuksen aikaansaaminen edellytti reseptorien yliekspressiota soluissa, ja pelkällä ligandikäsitteilyllä ei ollut vaikutusta (tulokset eivät näkyvissä). Molemmat yhdisteet vaimensivat  $\beta$ -kateniiniaktivoitua Wnt-signalointia.



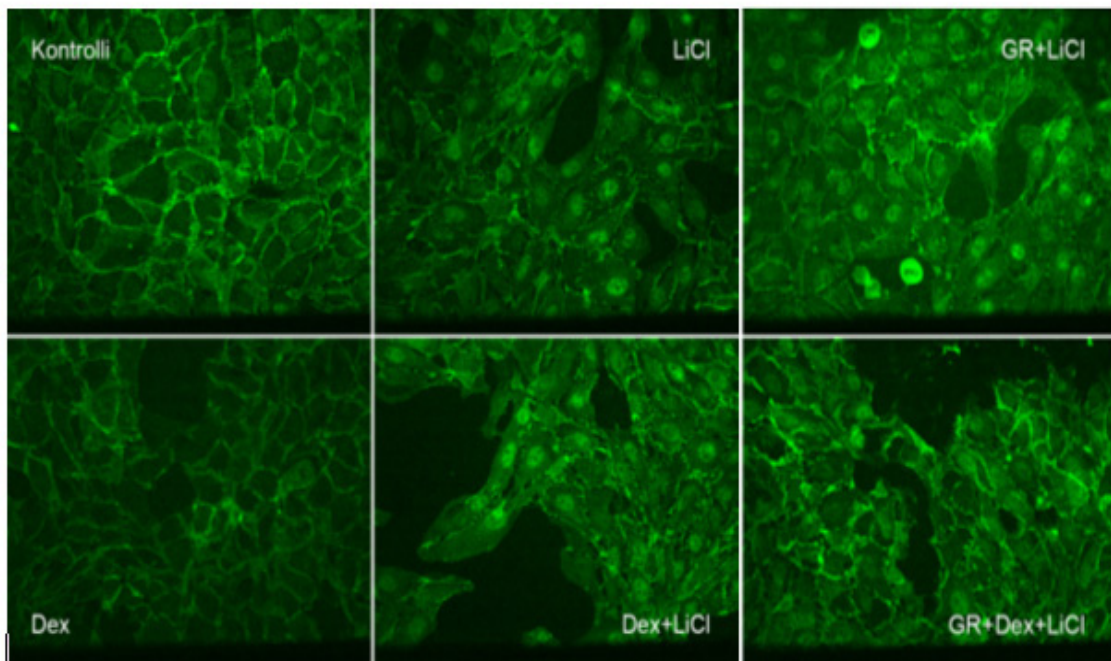
Kuva 11. Glukokortikoidien vaikutus  $\beta$ -kateniiniaktivoituun Wnt-signaalintireittiin. Soluihin transfektoitiin TOPflash-raportioijakonstruktiota, villityypin  $\beta$ -kateniinia tai stabiilia S<sup>33</sup>-kateniinia sekä pSG5-hGR-konstruktiota. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b)  $\beta$ -kateniinilla indusoituun tasoon verrattuna.



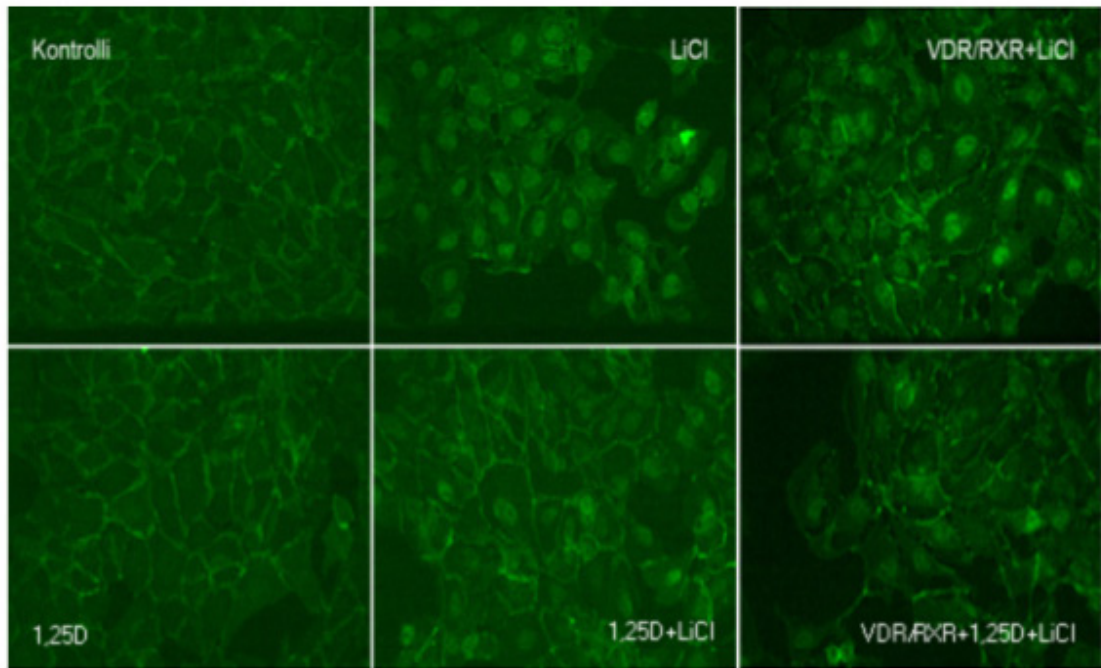
Kuva 12. Kalsitriolin vaikutus  $\beta$ -kateniiniaktivoituun Wnt-signaalointiin. Soluihin transfektoitiin TOPflash-raportioijakonstruktiota, villityypin  $\beta$ -kateniinia tai stabiilia S<sup>33</sup>-kateniinia sekä pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b)  $\beta$ -kateniinilla indusoituun tasoon verrattuna.

#### 5.4 Glukokortikoidit ja kalsitrioli translokalisoivat $\beta$ -kateniinia U2-Os-soluissa

Edelleen tarkasteltiin vaikuttavatko glukokortikoidit ja kalsitrioli solunsisäisen  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Odotetusti pelkkä Dex- tai kalsitrioli -käsittely ei vaikuttanut  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Ko. ligandeilla vaikutuksia ei myöskään havaittu, kun Wnt-signaalointireitti aktivoitiin LiCl:lla (kuva 13, kuva 14). Kun reseptoreita ilmennettiin, vähensivät glukokortikoidit ja kalsitrioli  $\beta$ -kateniinin tumalokalisaatiota U2-Os- soluissa. Tällöin  $\beta$ -kateniinin lokalisoituminen solukalvoille ja etenkin solujen välisiin kontaktipintoihin tehostui (kuva 13, kuva 14).



Kuva 13. Glukokortikoidien vaikutukset  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Soluihin transfektoitiin pSG5-hGR-konstruktiota. Primääri vasta-aineena käytettiin beta-kateniinia (Santa Cruz) ja sekundääri vasta-aineena anti-hiiri-FITC (Vector). Näytteet tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK). Objektiivin suurennus 20x.



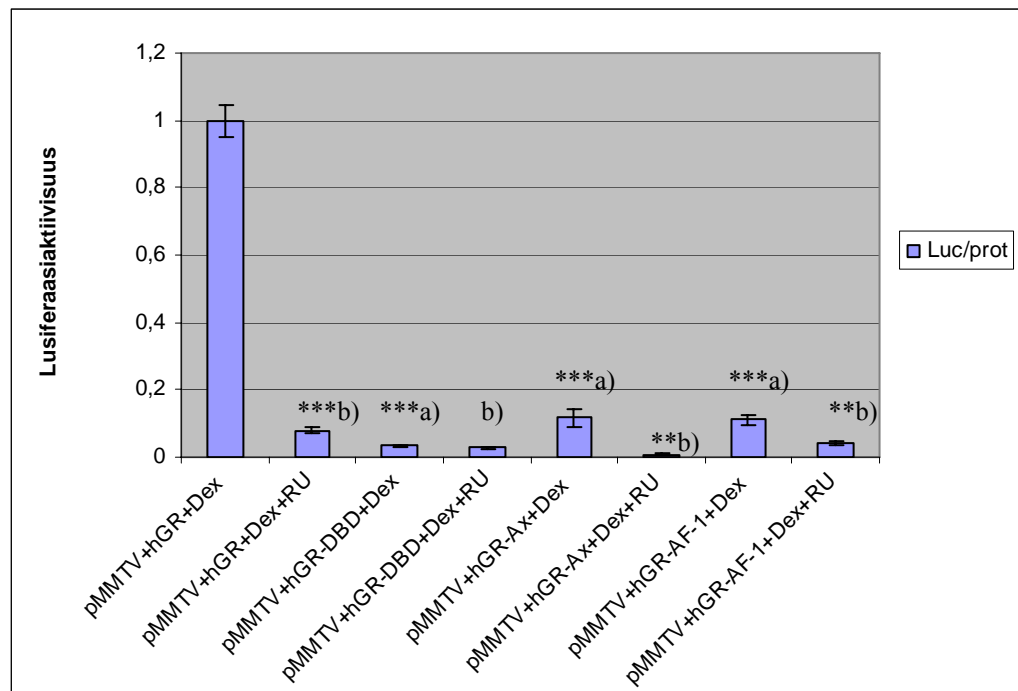
Kuva 14. Kalsitriolin vaikutukset  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Soluihin transfektoitiin pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja. Primääri vasta-aineena käytettiin beta-kateniinia (Santa Cruz) ja sekundääri vasta-aineena anti-hiiri-FITC (Vector). Näytteet tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK). Objektiivin suurennus 20x.

### 5.5 hGR- ja hVDR-mutantit moduloivat Wnt-signaalia

hGR- ja hVDR -mutanteilla pyrittiin selvittämään Wnt-signaaloinnin modulointiin osallistuvia reseptorien osia. hGR- ja hVDR- mutanttien transkriptionaalista kykyä tutkittiin pGL3-MMTV-(-1146/+88)-Luc ja (DR<sub>3</sub>)<sub>4</sub>- -raporttijakonstruktiin avulla. MMTV-raporttijakonstrukti sisältää GRE:n, lusiferaasireportterigeenin ja MMTV (mouse mammary tumor virus)-promoottorin. (DR<sub>3</sub>)<sub>4</sub>- raporttijakonstrukti sisältää neljä VDRE:ä sekä lusiferaasireportterigeenin

Tutkimuksessa käytettiin kolmea erilaista mutatoitua hGR:ia: hGR-DBD, hGR-Ax ja hGR-AF1. hGR-DBD käsittää aminohapot 1- 77 ja 262- 500, jotka muodostavat GR:n DBD-alueen. hGR-DBD:sta puuttuu siis GR:n LBD-alue sekä AF-1 alue. hGR-Ax käsittää aminohapot 418- 777, joten siitä puuttuu reseptorin NTD-alue. hGR-AF1:sta vastaavasti puuttuu reseptorin AF-1 alue, joka sijaitsee NTD-alueella (kuva 7). Ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa mutatoitujen hGR:den ilmentyminen soluissa sekä kulkeutuminen tumaan oli vahvistettu Western blot -kokeilla.

Kuvasta 15 nähdään, että MMTV-raportioijakonstrukti aktivoitui odotetusti, kun käytettiin Dex:n lisäksi GR:n yliekspressiota. Dex yksin ei aktivoinut MMTV-raportioijakonstrukti, koska U2-Os- soluissa ei ole merkittävästi endogeenistä GR:a (tulokset ei näkyvissä). Kokeissa käytettiin lisäksi vaikuttavana aineena RU38486 - yhdistettä, joka toimii mm. GR antagonistina. Antagonistinen vaikutus havaitaan huomattavana MMTV-raportioijakonstruktin aktiivisuuden laskuna. Tulosten mukaan mikään käytetyistä GR-mutanteista ei omannut transkriptionaalista aktiivisuutta.

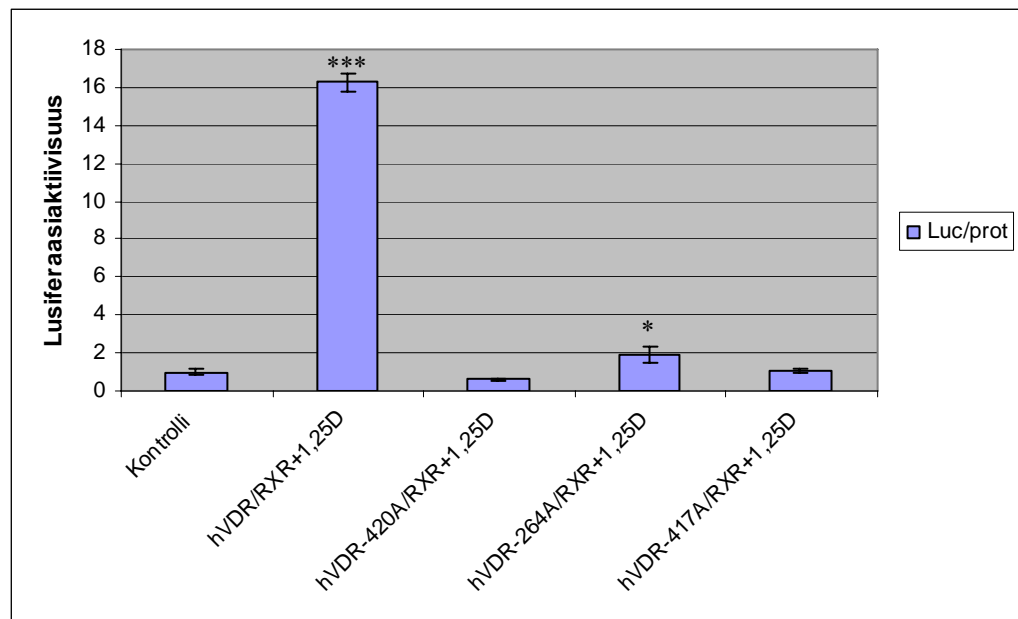


Kuva 15. hGR-mutanttien kyky aktivoida GRE:n sisältämää raportioijakonstrukti ja GR- antagonistin (RU38486) vaikutukset. Soluihin transfektoitiin pGL3-MMTV-(-1146/+88)-Luc-raportioijakonstrukti, pMT-hGR-konstrukti sekä pMT-hGR-DBD, pMT-hGR-Ax ja pMT-hGR-AF1. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo±keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) hGR+Dex- tasoon verrattuna ja b) RU-vaikutukset reseptorin aktivaatiotasoon.

hVRD:sta käytettiin pistemutantteja: hVDR-E420A, hVDR-K264A ja hVDR-L417A, joissa oli korvattu paikan 420 glutamaatti (E), paikan 264 lysiini (K) ja paikan 417 leusiini (L) alaniinilla (A). Tutkimukseen valittiin juuri nämä pistemutantit, koska niitä oli käytetty aikaisemmin tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin VDR:n ja  $\beta$ -kateniinin vuoropuhelua (Shah ym. 2006). Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedettiin, että mutaatiot kohdissa 417 ja 420 heikentävät VDR:n transaktivaatiota sekä sitoutumista koaktivaattoreihin (Jimenez-Lara & Aranda, 1999; Malloy ym. 1999). Kaikki hVDR-

pistemutantit pystyvät kuitenkin sitomaan ligandia ja muodostamaan heterodimeerin RXR:n kanssa.

Tutkimuksessa käytetyt hVDR-pistemutantit eivät aktivoineet  $(DR_3)_4$ -raporttoijakonstruktiota (kuva 16). Kontrollina käytettiin villityypin hVDR:a, joka yhdessä kalsitriolin kanssa aktivoi  $(DR_3)_4$ -raporttoijakonstruktiota  $17 \pm 2$  kertaista kontrolliin nähden.

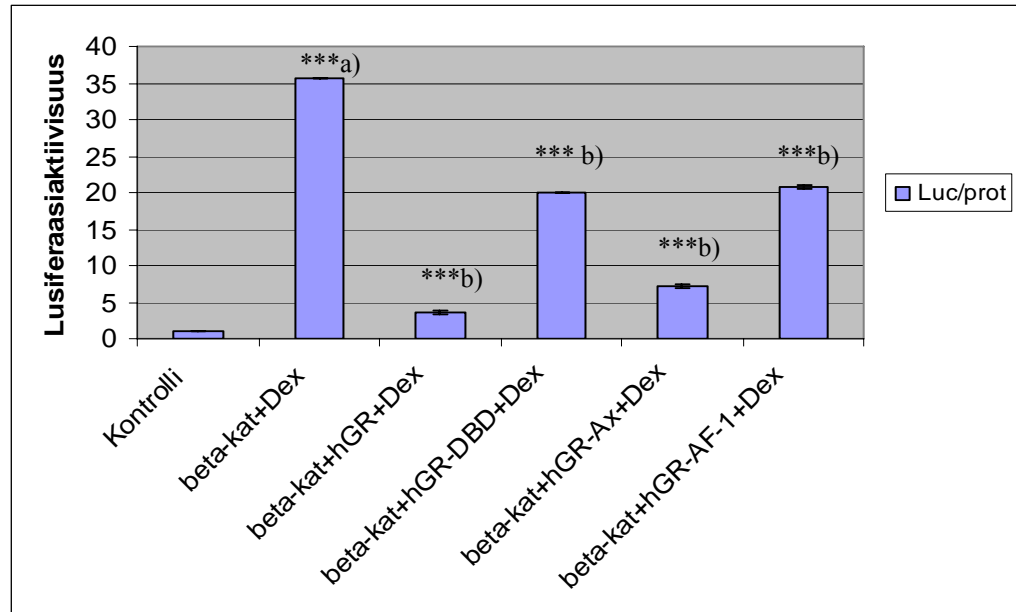


Kuva 16. hVDR-pistemutanttien kyky aktivoida VDRE:n sisältämää  $(DR_3)_4$ -raporttoijakonstruktiota. Soluihin transfektoitiin pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$ -konstrukteja sekä pistemutanteja pSG5-hVDR-417A, pSG5-hVDR-420A ja pSG5-hVDR-264A. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05.

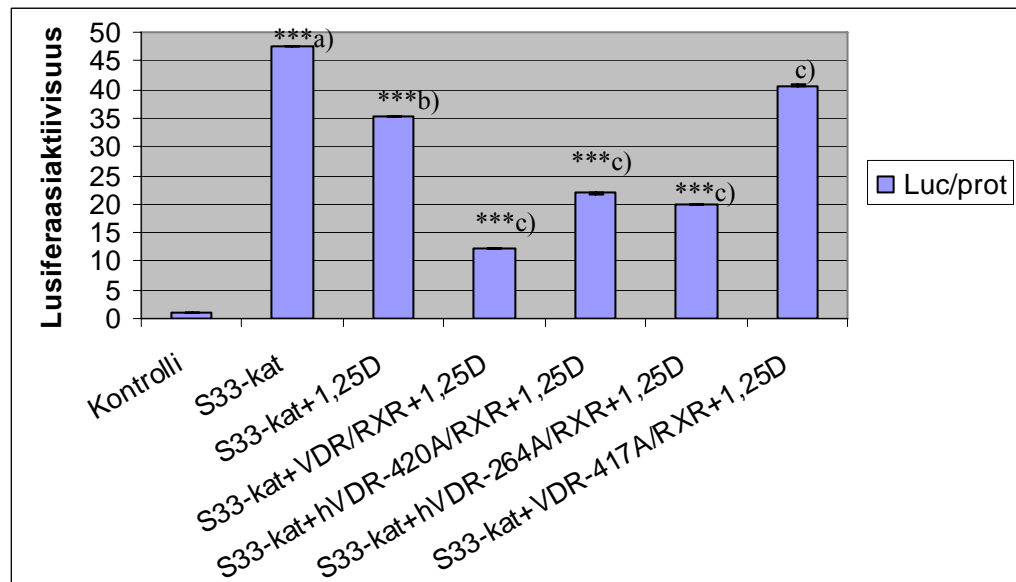
hGR- ja hVDR-mutantit kykenivät kuitenkin moduloimaan Wnt-signaalia (kuva 17, kuva 18). hGR-mutanteista tehokkaimmin Wnt-signaalia vaimensi hGR-Ax, josta puuttuu reseptorin NTD-alue. Kaikissa hGR-mutanteissa on jäljellä aminohapot 418-500, jotka kattavat osan reseptorin DBD-alueesta. Näiden tulosten pohjalta tätä reseptorin aluetta voidaan pitää potentiaalisena Wnt-signaalia moduloivana osana.

hVDR-E420A- ja hVDR-K264A -pistemutantit vaimensivat merkittävästi Wnt-signaaliin U2-Os -soluissa. hVDR-L417A- pistemutantilla ei ollut vaikutuksia Wnt-signaaliin. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että mutaatiot kohdissa E420 ja K264 eivät vaikuta VDR:n toimintaan Wnt-signaalin moduloijana. Sen sijaan

mutaatio kohdassa L417 vaikuttaa huomattavasti reseptorin kykyyn moduloida Wnt-signaalointia.



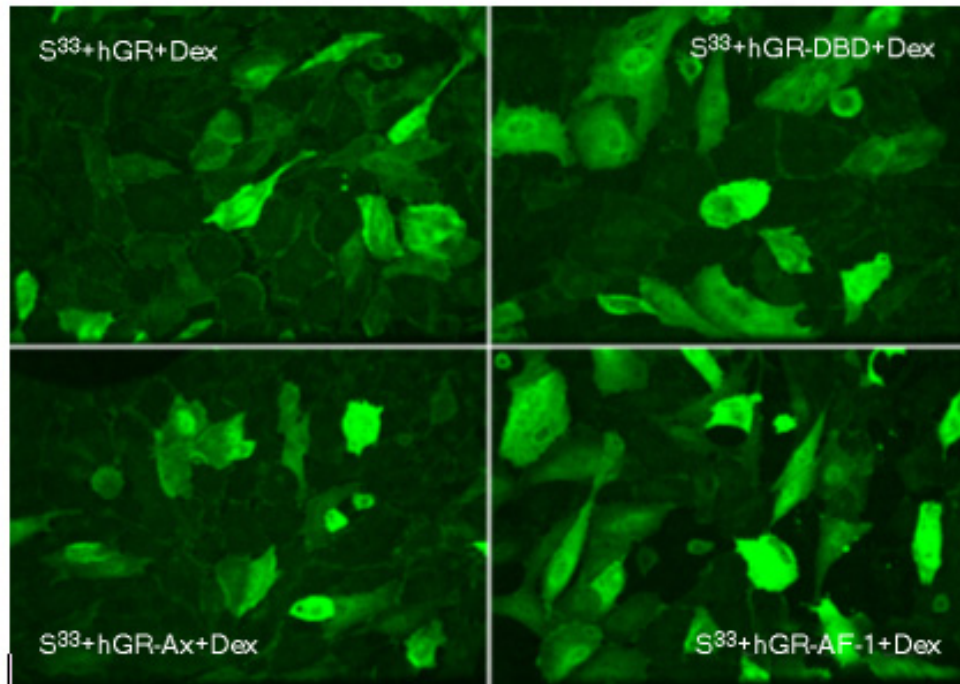
Kuva 17. hGR-mutanttien kyky moduloida Wnt-signaalointia. Soluihin transfektoitiin TOPflash-raporttijakonstruktiota, villityypin  $\beta$ -kateniinia, pMT-hGR-konstruktiota sekä pMT-hGR-DBD, pMT-hGR-Ax ja pMT-hGR-AF1. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo  $\pm$  keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b)  $\beta$ -kateniini indusoituun sekä Dex-käsiteltyyn tasoon verrattuna.



Kuva 18. hVDR-pistemutanttien kyky moduloida Wnt-signaalointia. Soluihin transfektoitiin stabiilia S<sup>33</sup>-kateniinia, pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja sekä pSG5-hVDR-417A, pSG5-hVDR-420A ja pSG5-hVDR-264A. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo $\pm$ keskihajonta (n=3), \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \* p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b)  $\beta$ -kateniini indusoituun tasoon verrattuna ja c)  $\beta$ -kateniini indusoituun ja 1,25D-käsiteltyyn tasoon verrattuna.



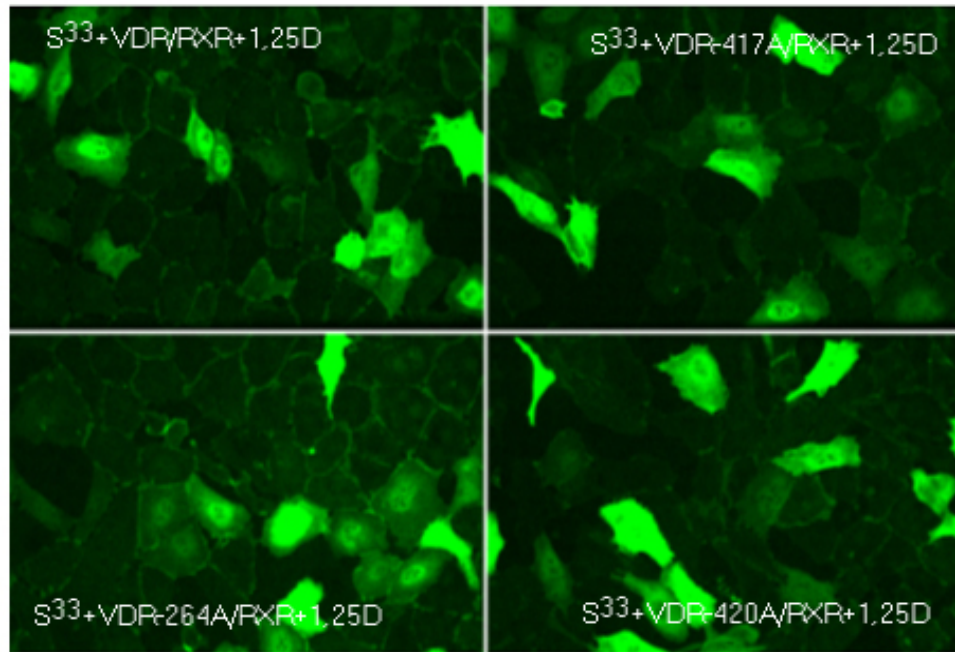
Edelleen tutkittiin mutatoitujen hGR:den ja hVDR:den kykyä säädellä  $\beta$ -kateniinin solulokalisatiota (kuva 19, kuva 20). hGR-mutanteista hGR-Ax translokalisoi tehokkaimmin  $\beta$ -kateniinia tumista solukalvoille. hGR-DBD- ja hGR-AF-1- muodoilla havaittiin enemmän tumavärjäytymistä ja vastaavasti heikompi kalvovärjäytyminen kuin hGR-Ax:lla ja villityypin hGR:lla.



Kuva 19. hGR-mutanttien vaikutukset  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Soluihin transfektoitiin stabiilia  $S^{33}$ -kateniinia, pMT-hGR-konstruktiota sekä pMT-hGR-DBD, pMT-hGR-Ax ja pMT-hGR-AF1. Primääri vasta-aineena käytettiin  $\beta$ -kateniinia (Santa Cruz) ja sekundääri vasta-aineena anti-hiiri-FITC (Vector). Näytteet tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK). Objektiivin suurennus 20x.

hVDR-pistemutantit eivät säädelleet  $\beta$ -kateniinin solulokalisatiota. Kaikilla pistemutanteilla havaittiin solukalvojen värjäytymistä ja tumien värjäytyminen oli voimakkaampaa kuin villityypin hVDR:lla.





Kuva 20. hVDR-pistemutanttien vaikutukset  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Soluihin transfektoitiin stabiilia  $S^{33}$ -kateniinia, pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja sekä pSG5-hVDR-417A, pSG5-hVDR-420A ja pSG5-hVDR-264A. Primääri vasta-aineena käytettiin beta-kateniinia (Santa Cruz) ja sekundääri vasta-aineena anti-hiiri-FITC (Vector). Näytteet tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Nikon Eclipse TE 300, Japani, Tokyo/PerkinElmer UltraVIEW Confocal Imaging System UK). Objektiivin suurennus 20x.

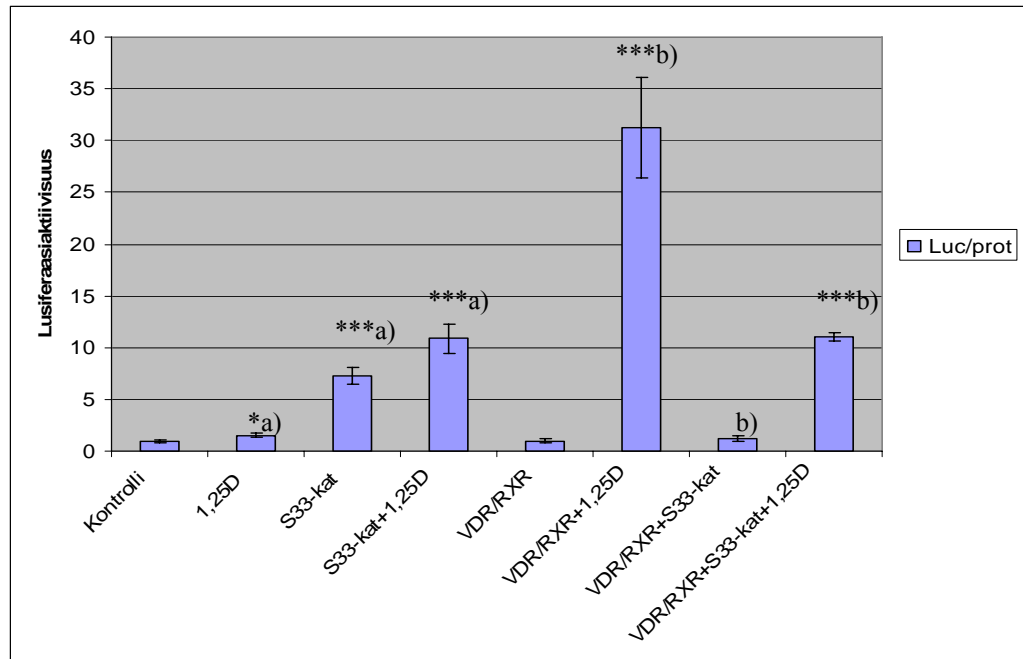
## 5.6 Wnt-signaalointireitti vaikuttaa kalsitrioliaktivoituun OCN-geenin luentaan

Wnt-signaalointireitin vaikutuksia kalsitriolin signaalointiin tutkittiin pLG3-OCN(910)-raportoijakonstruktiolla, joka sisälsi OCN-geenin promoottorin. OCN on osteoblastien tuottama GLA-proteiini, jonka uskotaan osallistuvan ainakin osteoblastien aktiivisuuden säätelyyn ja luun muodostuksen säätelyyn. Lisäksi OCN osallistuu luusolujen ulkoisen aineksen mineralisaatioon. Kanonisen signaalireitin on osoitettu vaientavan OCN-geenin luenta (Westendorf ym. 2004).

Raportoijakokeissa havaittiin, että kalsitrioli ei vaikuta OCN-geenin luentaan. Tämä tukee aikaisempia tuloksia, joiden mukaan kalsitrioli ei aktivoi OCN-geenin luenta U2-Os-osteosarkoomasoluissa (Mahonen ym. 1990). Wnt-signaalointireitin aktivointi  $\beta$ -kateniinin yliekspressiolla tehosti OCN-geenin luenta  $7 \pm 2$  suhteessa perustasoon nähden (kuva 21).

Kun käytettiin kalsitriolin lisäksi reseptorien yliekspressiota, OCN-geenin luenta tehostui suhteessa kontrollitasoon  $30 \pm 4$  kertaiseksi. Wnt-signaalointireitin aktivaatio  $\beta$ -

kateniinilla heikensi OCN- geenin luentaa merkittävästi.  $\beta$ -kateniini vaimentaa siis OCN- geenin luentaa U2-Os- soluissa, kun käytetään ligandin lisäksi reseptorien yliekspressiota.



Kuva 21. Wnt-signalointireitin vaikutus OCN-geenin luentaan. Soluihin transfektoitiin pLG3-OCN(910)-raportoijakonstruktiota, stabiilia  $S^{33}$ -kateniinia sekä pSG5-hVDR ja CMX-hRXR $\alpha$  -konstrukteja. Lusiferaasitulokset normalisoitiin kokonaisproteiinituloksiin. Tulokset keskiarvo $\pm$ keskihajonta (n=3). \*\*\* p< 0,001, \*\* p<0,01 ja \*p<0,05, a) perustasoon verrattuna ja b) VDR/RXR

## 5.7 Kalsitriolin ja Wnt-signaloinnin vaikutukset OCN-geenin mRNA-tasoihin

OCN-geenin ilmentymistä U2-Os- soluissa tutkittiin lisäksi kvantitatiivisella PCR – menetelmällä. Ilmentymistä tutkittiin, kun soluille oli tarjolla kalsitriolia sekä kalsitriolia ja VDR/RXR. Lisäksi tarkasteltiin Wnt- signalointireitin vaikutuksia OCN-geenin luentaan. Wnt- signalointireitin aktivointiin käytettiin stabiilin  $S^{33}$ -kateniinin yliekspressiota.

Tuloksissa ilmeni suurta hajontaa eri ajokertojen välillä. Kalsitrioli lisäsi OCN- geenin ilmentymistä, kun käytettiin ligandin lisäksi reseptorien yliekspressiota. Tulokset ovat ristiriitaisia raportoijakokeiden ja aikaisempien tutkimusten kanssa, joiden mukaan kalsitrioli ei vaikuta OCN-geenin luentaan U2-Os- soluissa. Wnt- signalointireitin

aktivoituminen ei merkittävästi vaikuttanut OCN-geenin luentaan. Vaikutuksia ei myöskään havaittu, kun soluille lisättiin kalsitrioli ja VDR/RXR.

## 6 POHDINTA

Wnt-signaalointireittejä tunnetaan ainakin kolme erilaista. Näistä kanoninen signaalireitti on tunnetuin ja se edistää mm. solun selviytymistä, erilaistumista ja proliferaatiota. Tässä työssä keskityttiin kanoniseen signaalireittiin, koska sillä tiedetään olevan merkittävä rooli luun muodostumisen ja luun resorption kontrolloinnissa (Glass & Karsenty 2006).

Wnt-signaalointireitin aktiivisuutta U2-Os -osteosarkoomasoluissa tutkittiin TOPflash-raporttoijakokeilla. Wnt-signaalointireitin aktivointiin käytettiin LiCl:a, joka on GSK3 $\beta$ -inhibiittori, sekä villityypin  $\beta$ -kateniinin tai stabiilin S<sup>33</sup>-kateniinin yliekspressiota. LiCl:lla TOPflash-raporttoijakonstruktion aktivoituminen oli heikompaa kuin kateniinin yliekspressiolla. Aktivaatio oli odotetusti voimakkainta stabiililla S<sup>33</sup>-kateniinilla, jota solu ei pysty hajottamaan. Negatiivisena kontrollina toiminut FOPflash-raporttoijakonstrukti ei aktivoitunut, joten menetelmät olivat spesifisiä ja aktivoivat juuri Wnt-signaalointireittiä. Raporttoijakokeet onnistuivat U2-Os-soluilla hyvin. Transfektiotehokkuus oli hyvä ja säilyi kokeesta toiseen.

Immunovärjäyskokeilla tarkasteltiin  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumista Wnt-signaalointireitin aktivoituessa. Kun soluille ei ole tarjolla Wnt- proteiineja, pidetään solunsisäisen  $\beta$ -kateniinin määrä vakaana. Kokeissa havaittiin, että Wnt-signaalointireitin aktivaatio johti  $\beta$ -kateniinin tumalokalisatioon. Immunovärjäys menetelmänä ei ole kvantitatiivinen, joten ns. määräerojen arviointiin tällä menetelmällä ei päästä. Jatkotutkimuksissa tulisi hakea menetelmiä, jotka antavat kvantitatiivisia tuloksia.

Kun Wnt-signaalointireitin aktivaatio U2-Os-soluissa oli varmistettu, tarkoituksena oli selvittää steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välisen vuoropuhelun molekulaarista mekanismia ihmisen osteoblastisissa soluissa. Tässä tutkimuksessa keskityttiin steroidien osalta glukokortikoideihin ja kalsitrioliin, joka on D<sub>3</sub>-vitamiinin biologisesti aktiivisin aineenvaihduntatuote. Steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välisestä vuoropuhelusta on näyttöä useiden kudosten ja steroidihormonien osalta. Vuoropuhelun mekanismia ei vielä täysin tunneta, mutta  $\beta$ -kateniinin uskotaan vaikuttavan steroidihormonien kanssa sekä paikallisella että transkriptionaalisella tasolla (Shah ym. 2003; Mullholland ym. 2005).

Steroidi- ja Wnt-signaaloinnin välisestä vuoropuhelusta luusoluissa on kuitenkin toistaiseksi vähän tietoa.

Androgeenireseptorin (AR) kohdalla signaalireittien vuoropuhelusta on eniten näyttöä. Ligandin läsnä ollessa AR sitoutuu  $\beta$ -kateniiniin ja kuljettaa sen tumaan (Pawlowski ym. 2002; Mullholland ym. 2002; Song ym. 2003). Tumaan translokalisoitunut  $\beta$ -kateniini kasvattaa AR:n transkriptionaalista aktiivisuutta, kun taas AR vaimentaa  $\beta$ -kateniinin aktivoimien Tcf-transkriptiotekijöiden aktiivisuutta. Retinoidihappo-reseptorin tiedetään vaikuttavan kanoniseen signaalireittiin rintasyöpä- (Shah ym. 2002) ja paksusuolensyöpäsoluissa (Easwaran ym. 1999). Myös VDR:n tiedetään sitoutuvan  $\beta$ -kateniiniin ja kilpailevan Lef/Tcf -transkriptiotekijöiden kanssa solun vapaasta  $\beta$ -kateniinista (Easwaran ym. 1999; Palmer ym. 2001; Yang ym. 2002). Lisäksi tiedetään, että ligandin läsnä ollessa VDR pystyy inhiboimaan  $\beta$ -kateniini- ja Lef/Tcf- riippuvaista geenin transkriptiota kasvainsolulinjoissa (Easwaran ym. 1999, Palmer ym. 2001, Chesire & Isaacs 2002; Mulholland ym. 2003).

Glukokortikoidien tiedetään vaikuttavan luun metaboliaan (Hakeda 2006; Conradie ym. 2007), mutta niiden vaikutusmekanismeja ei vielä täysin tunneta. Glukokortikoidien tiedetään edistävän osteoblastisen fenotyypin kehittymistä ja siten vaikuttavan mesenkymaalisten kantasolujen osteogeeniseen erilaistumiseen (Nuttelman ym. 2006). Glukokortikoidien vaikutukset välittyvät GR:n kautta, joka kuuluu tumareseptoreiden superperheeseen. Wnt-signaaloinnin ja glukokortikoidien vuoropuhelusta on tehty muutamia tutkimuksia. Glukokortikoidien tiedetään mm. indusoivan Wnt-antagonistin, Dickkopf 1 (Ohnaka ym. 2004) ja Tcf- $\beta$ -kateniini korepressorin HDAC1 ilmentymistä osteoblasteissa. HDAC1 inhiboi kohdegeenien luentaa muuttamalla kromatiinin asetylaatioastetta. (Smith & Frenkel 2005). Lisäksi glukokortikoidien tiedetään aktivoivan GSK3 $\beta$ :a, joka fosforyloi solun sisäistä vapaata  $\beta$ -kateniinia. Fosforyloitu  $\beta$ -kateniini ubiquitinoidaan ja hajotetaan proteosomaalisesti (Smith ym. 2002; Smith & Frenkel 2005). Dickkopf 1, HDAC1 ja GSK3 $\beta$  ovat kanonisen signaalireitin merkittäviä säätelytekijöitä. Myös kalsitriolin tiedetään vaikuttavan luun metaboliaan. Se mm. inhiboi osteoblastien proliferaatiota ja stimuloi useiden luuväliaineen proteiinien, kuten osteokalsiinin, osteopontiinin ja alkaalisen fosfataasin, tuotantoa (Atkins ym. 2003). Lisäksi kalsitriolin on havaittu edistävän mesenkymaalisten kantasolujen osteogeneesiä

*in vitro*. Kalsitriolin vaikutukset välittyvät VDR:n kautta, joka muodostaa heterodimeerin RXR:n kanssa ja kuuluu myös tumareseptoreiden superperheeseen.

Tässä tutkimuksessa glukokortikoidit ja kalsitrioli vaimensivat LiCl-aktivoitua Wnt-signaalointia U2-Os- soluissa. Vaimentuminen oli tehokkaampaa glukokortikoideilla, sillä ne vaimensivat Wnt-signaalointia 35 % suhteessa perustasaan, kun taas kalsitrioli vaimensi noin 20 %. Glukokortikoideilla ja kalsitriolilla Wnt-signaloinnin vaimentuminen oli tehokkainta, kun käytettiin ligandin lisäksi reseptorien yliekspressiota. Glukokortikoidien tapauksessa tätä tukevat aikaisemmat tutkimukset, joiden mukaan U2-Os -soluissa ei ole merkittävästi endogeenistä GR:a (Rogatsky ym. 1997). Tulos viittaa myös siihen, että U2-Os -soluissa ei ole merkittävästi endogeenistä VDR:a. Odotetusti glukokortikoidit ja kalsitrioli vaimensivat myös  $\beta$ -kateniini-aktivoitua Wnt-signaalointia, kun käytettiin ligandien lisäksi reseptorien yliekspressiota.

Luukudoksen jatkuva altistus steroideille heikentää luun muodostumista. Luun muodostuminen vähenee, koska osteoblastisten solujen proliferaatiota inhiboidaan ja toisaalta niiden apoptoottista kuolemaa edistetään (Walsh ym. 2001). Luun muodostumisen väheneminen aiheuttaa lopulta luukatoa ja luun heikkenemistä, jotka johtavat edelleen kasvavaan murtumarisktiin (Kaji ym. 2006) ja GIO:n kehittymiseen. Tämän tutkimuksen mukaan glukokortikoidit vaimensivat merkittävästi Wnt-signaalointia U2-Os- soluissa. Wnt- signaloinnin vaimeneminen voisi osaltaan selittää GIO:n kehittymisen, koska Wnt-signaloinnin tiedetään tehostavan osteoblastien proliferaatiota ja kypsien osteoblastien osteoprotegeriini eristystä, joka inhiboi luun resorptiota (Rawadi ym. 2003; Bennett ym. 2005).

Tutkimuksissa tarkasteltiin myös glukokortikoidien ja kalsitriolin vaikutuksia  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. Oletuksena oli, että glukokortikoidit heikentäisivät  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumista tumaan, jossa se vaikuttaa Wnt-signaalointireitin kohdegeenien ilmentymiseen ainakin Lef/Tcf -transkriptiotekijöiden välityksellä. Tutkimuksissa havaittiin, että pelkällä ligandilla ei ollut vaikutusta  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen solujen perustilassa eikä myöskään silloin, kun Wnt-signaalointireitti aktivoitiin LiCl:lla. Kun käytettiin ligandin lisäksi reseptorien yliekspressiota, havaittiin glukokortikoidien ja kalsitriolin vähentävän  $\beta$ -kateniinin tumalokalisatiota. Vastaavasti solukalvojen värjäytyminen tehostui, joten glukokortikoidit ja kalsitrioli

translokalisoivat  $\beta$ -kateniinin solukalvoille ja etenkin solujen välisiin kontaktipintoihin. Translokalisaaation selitys voisi olla, että GR ja VDR sitoutuvat  $\beta$ -kateniiniin ja kuljettavat sitä solukalvoille.

Tutkimuksessa kartoitettiin lisäksi sitä GR:n ja VDR:n osaa, joka mahdollisesti osallistuisi Wnt-signaaloinnin modulointiin. Kartoituksessa käytettiin kolmea erilaista hGR-mutanttimuotoa: hGR-DBD, hGR-Ax ja hGR-AF1. hGR-DBD käsittää aminohapot 1- 77 ja 262- 500, jotka muodostavat GR:n DBD-alueen. Mutatoidusta muodosta puuttuu siis GR:n LBD-alue sekä AF-1 alue. hGR-Ax käsittää aminohapot 418- 777, joten siitä puuttuu reseptorin NTD-alue. hGR-AF1:sta vastaavasti puuttuu reseptorin AF-1 alue, joka sijaitsee NTD-alueella. VDR:sta käytettiin pistemutatoituja muotoja: hVDR-E420A, hVDR-K264A ja hVDR-L417A. Pistemutanteissa paikkojen 420, 264 ja 417 aminohapot olivat muunnettu alaniiniksi. Näitä mutatoituja muotoja oli käytetty aikaisemmin tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin VDR:n ja  $\beta$ -kateniinin yhteyttä (Shah ym. 2006).

Mutatoitujen hGR:den ja hVDR:den transkriptionaalista aktiivisuutta tutkittiin GRE- ja VDRE-mallin avulla. Tutkimuksissa mikään käytetyistä hGR- ja hVDR-mutanteista ei omannut transkriptionaalista aktiivisuutta. hGR- ja hVDR-mutantit kykenivät kuitenkin moduloimaan Wnt-signaalointia. Tehokkaimmin Wnt-signaalointia vaimensivat hGR-mutanteista hGR-Ax ja hVDR-mutanteista E420A- ja K264A-muodot.

Lisäksi tarkasteltiin hGR- ja hVDR- mutanttien vaikutuksia  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen. hGR-mutanteista hGR-Ax translokalisoi tehokkaimmin  $\beta$ -kateniinia tumista solukalvoille, mutta myös hGR-DBD- ja hGR-AF-1- muodoilla havaittiin translokalisatiota. Raportoijakokeiden perusteella voidaan sanoa, että hGR- mutantit kykenevät moduloimaan Wnt-signaalointia. Mutatoitujen muotojen vaikutukset Wnt-signaalointiin ja  $\beta$ -kateniinin lokalisoitumiseen vastasivat villityypin hGR:n vaikutuksia. Tämä viittaa siihen, että mutanteissa muodoissa on jäljellä se alue reseptorista, joka vaikuttaa  $\beta$ -kateniinin translokalisoitumiseen. Kaikissa mutanteissa on jäljellä aminohapot 418- 500, jotka kattavat osan reseptorin DBD-alueesta. Tällä alueella sijaitsee mm. kalretikuliinin sitoutumiskohta. Kalretikuliini puolestaan kontrolloi GR:n kulkeutumista tumaan sekä  $\beta$ -kateniinin solunsisäistä liikennettä (Fadel ym. 2001; Holaska ym. 2001).

Tässä tutkimuksessa hVDR-pistemutantteilla ei havaittu vaikutuksia  $\beta$ -kateniinin translokaloitumiseen. Villityypin hVDR/RXR-heterodimeeri yhdessä kalsitriolin kanssa translokaloisoi  $\beta$ -kateniinia tumasta solukalvoille. Aikaisemmissa tutkimuksissa  $\beta$ -kateniini pystyi sitoutumaan villityypin hVDR:n lisäksi E420Q-pistemutanttiin, mutta ei L417S- ja K264A-pistemutantteihin (Shah ym. 2006). Lokalisoitumiskokeiden perusteella tätä ei voitu varmistaa. Raportoijakokeiden mukaan E420A- ja K264A-pistemutanttien vaikutukset Wnt-signalointiin vastasivat villityypin hVDR:n vaikutuksia. Wnt-signaloinnin vaimeneminen voisi johtua esimerkiksi siitä, että reseptorit sitoutuvat  $\beta$ -kateniiniin tai Lef/Tcf –transkriptiotekijöihin. Mutaatio kohdassa L417 sai aikaan sen, että reseptori ei kyennyt vaimentamaan Wnt-signalointia. Näiden tulosten perusteella mutaatio kohdassa L417 muuttaisi reseptoria niin, että se ei enää kykene vaimentamaan Wnt-signalointia villityypin hVDR:n tavoin.

Tutkimuksessa haluttiin lisäksi tarkastella Wnt- signaloinnin vaikutuksia kalsitriolin signalointiin. Tarkasteltavaksi valittiin OCN-geeni, jonka luentaa kalsitrioli ei aktivoi U2-Os- soluissa (Mahonen ym. 1990). Vastaavasti kanonisen signaalireitin on osoitettu vaimentavan OCN-geenin luentaa (Westendorf ym. 2004). Raportoijakokeissa saatiin selville, että OCN-geenin luenta tehostui merkittävästi, kun käytettiin kalsitriolin lisäksi reseptoridimeerin VDR/RXR yliekspressiota. Vastoin odotuksia Wnt-signalointireitin aktivaatio  $\beta$ -kateniinin yliekspressiolla tehosti OCN-geenin luentaa merkittävästi. Toistokokeessa geenin luenta ei tehostunut merkittävästi, joten tätä tulosta ei voida pitää luotettavana. Sen sijaan  $\beta$ -kateniini vaimensi OCN- geenin luentaa U2Os- soluissa, kun käytettiin ligandin lisäksi reseptorien yliekspressiota. Tämä viittaisi siihen, että  $\beta$ -kateniinin ja VDR/RXR-heterodimeerin välillä olisi jokin yhteys. Eräs mahdollinen yhteys on se, että  $\beta$ -kateniini syrjäyttää VDR/RXR-heterodimeerin tai OCN-geenin luentaan tarvittavan koaktivaattorin.

OCN-geenin mRNA-tasoja U2-Os- soluissa tutkittiin lisäksi kvantitatiivisella PCR:lla. Kalsitrioli lisäsi OCN-geenin ilmentymistä, kun käytettiin reseptorien (VDR/RXR) yliekspressiota. Vastaavasti Wnt- signalointireitti vaimensi OCN-geenin ilmentymistä, kun soluille oli tarjolla kalsitrioli ja VDR/RXR. Tuloksissa esiintyi kuitenkin suurta hajontaa ajokertojen välillä. Myös dissosiaatiokäyristä oli havaittavissa, että tuotteen monistuminen ei ollut spesifistä, joten tuloksia ei voida pitää luotettavina.



Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää steroidi- ja Wnt- signaloinnin välisen vuoropuhelun molekulaarista mekanismia ihmisen osteoblastisissa soluissa. Wnt- signalointi aktivoitui U2-Os- soluissa LiCl:lla sekä villityypin  $\beta$ -kateniinin tai stabiilin  $S^{33}$ -kateniinin yliekspressiolla. Odotetusti aktivaatio oli tehokkainta stabiililla  $S^{33}$ -kateniinilla. Glukokortikoidit ja kalsitrioli vaimensivat LiCl-aktivoitua ja  $\beta$ -kateniini-aktivoitua Wnt- signalointia, kun käytettiin ligandien lisäksi reseptorien yliekspressiota. Glukokortikoideja käytetään mm. autoimmuunisairauksien ja tulehdustilojen hoidossa. Pitkäkestoisen kortisolilääkityksen on havaittu indusoivan GIO:n kehittymistä. GIO:n kehittymistä voisi osaltaan selittää Wnt-signaloinnin vaimeneminen, koska Wnt-signaloinnin tiedetään olevan merkittävä tekijä luun uudismuodostuksen ja hyvinvoinnin kannalta.

## 7 LÄHTEET

Alford AI & Hankenson KD, 2006. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling and regeneration. *Bone* **38**: 749- 757.

Alonso L & Fuchs E, 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* **17**: 1189- 1200.

Askmyr MK, Fasth A & Richter J, 2008. Towards a better understanding and new therapeutics of osteopetrosis. *Br J Haematol.* **140**: 597- 609.

Atanasov AG & Odermatt A, 2007. Readjusting the glucocorticoid balance: an opportunity for modulators of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* **7**: 125- 140.

Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S & Evdokiou A, 2003. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J.Bone Miner. Res.* **18**: 1088- 1098.

Aubin JE & Bonnelye E, 2000. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* **11**: 905- 913.

Baron R, 1993. Anatomy and Ultrastructure of Bone. Teoksessa: MJ Favus (toim.), Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism- An Official Publications of The American Society for Bone and Mineral Research, s. 3-9. 441 s. Raven Press, New York, USA.

Bar-Shavit Z, 2007. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem.* **102**: 1130- 1139.

Baskakov IV, Kumar R, Srinivasan G, Ji Y, Bolen DW & Thompson EB, 1999. Trimethylamine N-oxide-induced cooperative folding of an intrinsically unfolded

transcription-activating fragment of human glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* **274**: 10693– 10696.

Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D & Birchmeier W, 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**: 596- 599.

Bejsovec A, 2000. Wnt signaling: an embarrassment of receptors. *Curr Biol.* **10**: 19- 22.  
Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD & MacDougald OA, 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **102**: 3324- 3329.

Bienzi M & Clevers H, 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**: 311- 320.

Birchmeier W, 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**: 596- 599.

Bonucci E, 2000. Basic composition and structure of bone. Teoksessa: YH An & RA Draughn (toim.), *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*, s. 3-21. 648 s. CRC Press, Boca Raton, USA.

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K & Lifton RP, 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* **346**: 1513- 1521.

Bredenberg J & Nilsson L, 2002. Conformational states of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain from molecular dynamics simulations. *Proteins.* **49**:24- 36.

Brown MS & Goldstein JL, 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **76**: 3330- 3337.

Burger EH & Klein-Nulend J, 1999. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* **13**: S101– S112.

Caricasole A, Copani A, Caruso A, Caraci F, Iacovelli L, Sortino MA, Terstappen GC & Nicoletti F, 2003. The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* **24**: 233- 238.

Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK, Warlow PM, Zhang SF, Zhang L, Suzuki S, St John T, Chesire DR & Isaacs WB, 2002. Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/TCF signaling by androgen receptor. T cell factor. *Oncogene* **21**: 8453- 8469.

Civitelli R, 1998. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.* **13**: 633- 644.

Conradie MM, de Wet H, Kotze DD, Burrin JM, Hough FS & Hulley PA, 2007. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts in vitro and osteocytes in vivo. *J Endocrinol.* **195**: 229- 240.

Copik AJ, Webb MS, Miller AL, Wang Y, Kumar R & Thompson EB, 2006. Activation function 1 of glucocorticoid receptor binds TATA-binding protein in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* **20**: 1218- 1230.

David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L & Guignandon A, 2007. Mechanical loading down regulates PPAR{gamma} in bone marrow stromal cells and favours osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* **22**: [Epub ahead of print]

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L & Yang Y, 2005. Wnt/beta-catenin signalling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* **8**: 739- 750.

de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S & Huang W, 2000. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* **19**: 389- 394.

De Nijs RN, 2008. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options. *Minerva Med.* **99**: 23- 43.

- Easwaran V, Pishvaian M & Byers S, 1999. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol*. **9**: 1415- 1418.
- Escriva H, Bertnard S & Laudet V, 2004. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* **40**: 11- 26.
- Fadel MP, Szewczenko-Pawlikowski M, Leclerc P, Dziak E, Symonds JM, Blaschuk O, Michalak M & Opas M, 2001. Calreticulin affects beta-catenin associated pathways. *J Biol Chem* **276**: 27083- 27089.
- Feng H, Cheng T, Pavlos NJ, Yip KH, Carrello A, Seeber R, Eidne K, Zheng MH & Xu J, 2008. Cytoplasmic terminus of a vacuolar type proton pump accessory subunit Ac45 is required for proper interaction with V0 domain subunits and efficient osteoclastic bone resorption. *J Biol Chem* [Epub ahead of print]
- Framson PE & Sage EH, 2004. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* **92**: 679– 690.
- Franz-Odendaal TA, Hall BK & Witten PE, 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. **235**: 176- 190.
- Gartner LP & Hiatt JL, 2001. Color Textbook of Histology. 2. painos. 592 s. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Giles RH, van Es JH & Clevers H, 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signalling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**: 1- 24.
- Glass II DA & Karsenty G, 2006. Molecular Bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol* **73**: 43- 84.
- Glorieux FH, 2007. Treatment of osteogenesis imperfecta: who, why, what? *Horm Res* **5**: 8- 11.

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM ym. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**: 513- 523.

Habas R, Dawid IB & He X, 2003. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**: 295- 309.

Hakeda Y, 2006. Action of glucocorticoid on bone-forming and bone-resorbing cells. *Clin Calcium* **16**: 1817- 1822.

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO & Gimble JM, 2001. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **7**: 729- 741.

Hammes SR & Levin ER, 2007. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* **28**: 726- 741.

Hartmann C, 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* **16**: 151- 158.

Haug E, Sand O, Sjaastad ØV & Toverud KC, 1999. Ihmisen Fysiologia. 2. painos. 526 s. WSOY, Porvoo.

Hazenber JG, Taylor D & Lee TC, 2007. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* **1**: 1- 8.

Heath JW & Young B, 2000. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 4. painos. 413 s. Churchill Livingstone, UK.

Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F & Kemler R, 2000. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* **19**: 1839– 1850

Hendy GN, Hruska KA, Mathew S & Goltzman D, 2006. New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. *Kidney Int* **69**: 218– 223.

Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J & Paschal BM, 2001. Calreticulin Is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol* **152**: 127- 140.

Hu R, Niles EG & LoVerdePT, 2006. DNA binding and transactivation properties of the *Schistosoma mansoni* constitutive androstane receptor homologue. *Mol Biochem Parasitol* **150**: 174- 185.

Huang CH & Klein PS, 2004. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* **5**: 234.

Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC & Krumlauf R, 2003. Wise, a context-dependent phosphorylation activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* **130**: 4295- 4305.

Jiang J & Struhl G, 1998. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* **391**: 493- 496.

Jiang JX, Siller-Jackson AJ & Burra S, 2007. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosc* **12**: 1450- 1462.

Kaartinen M, 1999. Functional relationship of osteocalcin and osteopontin in the maturation of bone matrix. 68 s. Kuopion yliopiston julkaisu. C, Luonnontieteet ja ympäristötieteet. Kuopion Yliopisto, Kuopio.

Kaji H, Yamauchi M, Chihara K & Suqimoto T, 2006. The threshold of bone mineral density for vertebral fracture in female patients with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocr J* **53**: 27- 34.

Kassel O & Herrlich P, 2007. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* **275**:13- 29.

Kauppi B, Jakob C, Farnegardh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, Calles K, Engstrom O, Harlan J, Muchmore S, Ramqvist AK, Thorell S, Ohman L, Greer J, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J & Carlquist M, 2003. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem* **278**: 22748-22754.

Kawano Y & Kypta R, 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**: 2627- 2634.

Kazanecki CC, Uzwiak DJ & Denhardt DT, 2007. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* **102**: 912- 924.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedqe P, McKechnie D ym. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**: 661- 665.

Kucera T, Waltner-Law M, Scott DK, Prasad R & Granner DK, 2002. A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol Chem* **277**: 26098- 26102.

Kumar R & Thompson EB, 2005. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure:function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**:383- 394.

Kumar R, Volk DE, Li J, Lee JC, Gorenstein DG & Thompson EB, 2004. TATA box binding protein induces structure in the recombinant glucocorticoid receptor AF1 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16425- 16430.

Lane TF & Sahe EH, 1994. The biology of SPARC, a protein that modulated cell-matrix interactions. *FASEB J* **8**: 163- 173.



Lavery DN & McEwan IJ, 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* **391**: 449- 464.

Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benehekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A ym. 2002. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* **70**: 11-19.

Liu F, Kohlmeier S & Wang CY, 2007. Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* [Epub ahead of print].

Mahonen A, Pirskanen A, Keinänen R, Mäenpää PH, 1990. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on its receptor mRNA levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* **48**: 30- 37.

Malinauskas T, 2008. Docking of Fatty Acids into the WIF Domain of the Human Wnt Inhibitory Factor-1. *Lipids* **43**:227- 230.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ & Hanski C, 1999. Target genes of beta-catenin-T cellfactor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1603– 1608.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L & Wu D, 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* **7**: 801- 809.

McKenna NJ & O'Malley BW, 2001. Nuclear receptors, coregulators, ligands and selective receptor modulators:making sense of the patchwork quilt. *Ann NY Acad Sci* **949**: 3-5.

Meijer L, Flajolet M & Greengard P, 2004. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 471- 480.

Messer Jr W, 2000. Steroid hormones and receptors. Päivitetty 3.4.2000. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/steroids.htm>. Viitattu 10.3.2008.

Miller JR, 2001. The Wnts. *Genome Biol.* **3**: reviews 3001.1-3001.15

Moon RT, Bowerman B, Boutros M & Perrimon N, 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**: 1644- 1646.

Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee G.A & Nelson CC, 2005. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* **26**: 898-915.

Mulholland DJ, Read JT, Rennie PS, Cox ME & Nelson CC, 2003. Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signalling axis. *Oncogene* **22**: 5602-5613.

Müller B, Prante C, Gastens M, Kuhn J, Kleesiek K & Götting C, 2008. Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* **27**: 139- 149.

Muraglia A, Cancedda R & Quarto R, 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113**: 1161- 1166.

Nakamura RE, Hunter DD, Yi H, Brunken WJ & Hackam AS, 2007. Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. *BMC Cell Biol* **8**: 52.

Nezbedova P & Brtko J, 2004.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inducible transcription factor and its role in the vitamin D action. *Endocr Regul* **38**: 29- 38.

Niemann S, Zhao C, Paseu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL & Muller U, 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* **74**: 558- 563.

Niemi M & Väänänen HK, 1993. Ihmisyksilön kehitysbiologia. 1.painos. 144 s. Kustannus Oy Duodecim, Gummerus, Helsinki.

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S & Hedge P, 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**: 665- 669.

Norman AW, 1998. Receptors for  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : Past, present and future. *J Bone Miner Res* **13**: 1360- 1369.

Nusse R, 2008. The Wnt Homepage. Päivitetty 3.1.2008. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>. Viitattu 10.3.2008.

Nuttelman CR, Tripodi MC & Anseth KS, 2006. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs. *J Biomed Mater Res A*. **76**: 183- 195.

Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H & Takayanagi R, 2004. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: Novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 259– 264.

Orti E, Bodwell JE & Munck A, 1992. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* **13**: 105- 128.

Painter SE, Kleerekoper M & Camacho PM, 2006. Secondary osteoporosis: a review of the recent evidence. *Endocr Pract* **12**: 436- 445.

Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M & Munoz A, 2001. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signalling. *J Cell Biol* **154**: 369- 387.

Panomix Quantitative Biology, 2007. Verkkodokumentti. Saatavilla: [http://www.panomics.com/product.php?product\\_id=94](http://www.panomics.com/product.php?product_id=94). Viitattu 12.5.2008.

Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM & Wierman ME, 2002. Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**: 20702– 20710.

Penn State of Agricultural Sciences, 2008. Gene Control in Eukaryotes. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.cas.psu.edu/docs/CASDEPT/VET/classes/vsc597b/CMMT%20597b%20lecture%204.html>. Viitattu 12.3.2008.

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T & de Robertis EM, 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707- 710.

Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, Isidori AM, 2008. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**: 292-299.

Piotrowski P, Burzynski M, Lianeri M, Mostowska M, Wudarski M, Chwalinska-Sadowska H, Jagodzinski PP, 2007. Glucocorticoid receptor beta splice variant expression in patients with high and low activity of systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol.* **45**: 339- 342.

Pujols L, Mullol J & Picado C, 2007. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* **7**: 93- 99.

Queen Mary, University of London, 2008. Bone Ossification & Growth. Päivitetty 4.4.2008. Verkkodokumentti. Saatavilla:

<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/bone/>. Viitattu 10.1.2008.

Rammelt S, Schulze E, Witt M, Petsch E, Biewener A, Pompe W & Zwipp H, 2004. Collagen type I increases bone remodelling around hydroxyapatite implants in the rat tibia. *Cells Tissues Organs* **178**: 146- 157

Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R & Roman-Roman S, 2003. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* **18**: 1842- 1853.

Riggs BL & Melton LJ III, 1986. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* **314**: 1676- 1686.

Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H & Laudet V, 2003. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* **116**: 585– 586.

Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastri BS, Rosen ED & Spiegelman BM, 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 145- 71.

Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B & Moras D, 2000. Crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* **5**: 173– 179.

Rogatsky I, Trowbridge JM & Garabedian MJ, 1997. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol* **6**: 3181- 3193.

Ross MH & Pawlina W, 2006. Histology -A Text And Atlas with correlated Cell and Molecular Biology. 5. painos. 905 s. Lippincott Williams & Wilkins, USA.

- Rulifson EJ, Wu CH & Nusse R, 2000. Pathway specificity by the bifunctional receptor frizzled is determined by affinity for wingless. *Mol Cell* **6**: 117- 126.
- Ryhanen S, Jaaskelainen T, Saarela JT & Maenpaa PH, 1998. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of osteoblastic cells by a novel 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog with an extensively modified side chain (CB1093). *J Cell Biochem* **70**: 414-424.
- Satoh W, Matsuyama M, Takemura H, Aizawa S & Shimono A, 2008. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* **46**: 92- 103.
- Schaaf MJ, Champagne D, van Laanen IH, van Wijk DC, Meijer AH, Meijer OC, Spaink HP, Richardson MK, 2008. Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. *Endocrinology* **149**: 1591- 1599.
- Schaaf MJ & Cidlowski JA, 2002 Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**: 37– 48.
- Semenov MV & He X, 2006. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* **281**: 38276- 38284.
- Shah S, Hecht A, Pestell R & Byers ST, 2003 Trans-repression of  $\beta$ -catenin activity by nuclear receptors. *J Biol Chem* **28**: 48137- 48145.
- Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, Rizvi I, Rao M, Herrell R, Zinser G, Valrance M, Aranda A, Moras D, Norman A, Welsh J, Byers SW, 2006. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell* **21**: 799- 809.
- Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V, Brown PH & Byers SW, 2002 The role of cadherin, beta-catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation. *J Biol Chem* **277**: 25313- 25322.

Shankavaram UT, de Witt DL, Funk SE, Sage EH & Wahl LM, 1997. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* **173**: 327- 334.

Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC & He TC, 2006. CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* **26**: 2955- 2964.

Simonet S, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen H, Wooden S, Bennett T & Boone T, 1997. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309- 319.

Smith E, Coetzee GA & Frenkel B, 2002. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* **277**: 18191- 18197.

Smith E & Frenkel B, 2005. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* **280**: 2388- 2394.

Solakidi S, Psarra AM & Sekeris CE, 2007. Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* **7**: 240- 245.

Song LN, Herrell R, Byers S, Shah S, Wilson EM & Gelmann Ep, 2003. Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **23**: 1674– 1687.

Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR & Genever PG, 2006. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* **119**: 1283- 1296.

Staal FJ & Clevers HC, 2003. Wnt signalling in the thymus. *Curr Opin Immunol* **15**: 204- 208.

Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR & Scadden DT, 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* **201**: 1781-1791.

Sun Y, Kolligs FT, Hottiger MO, Mosavin R, Fearon ER & Nabel GJ, 2000. Regulation of beta-catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12613– 12618.

Suomen Osteoporoosiliitto ry, 2008. Luusto ja osteoporoosi. Verkkodokumentti. Saatavilla: [http://www.osteoporoosiliitto.fi/sivu.php?artikkeli\\_id=2](http://www.osteoporoosiliitto.fi/sivu.php?artikkeli_id=2). Viitattu 12.5.2007.

Takahashi-Yanaga F & Sasaguri T, 2007. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* **104**: 293- 302.

Takayama S, Rogatsky I, Schwarcz LE & Darimont BD, 2006. The glucocorticoid receptor represses Cyclin D1 by targeting the Tcf- $\beta$ -catenin complex. *J Biol Chem* **281**: 17856- 17863.

Tang CH, Yang RS, Chen YF & Fu WM, 2007. Basic fibroblast growth factor stimulates fibronectin expression through phospholipase C gamma, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappaB, and p300 pathway in osteoblasts. *J Cell Physiol* **211**: 45- 55.

Termine JD, 1993. Bone Matrix Proteins and the Mineralization Process. Teoksessa: MJ Favus (toim.), Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism- An Official Publications of The American Society for Bone and Mineral Research, s. 21- 25. 441 s. Raven Press, New York, USA.

Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F & Buttyan R, 2006. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J Cell Biochem* **99**: 402- 410.



Tetsu O & McCormick F, 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422– 426.

Toell A, Polly P & Carlberg C, 2000. All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality in vitro. *Biochem J* **352**: 301- 309.

Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, Graig JE, Jiang L, Yang Z, Trembath R, Woodruff G, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K, Parker MJ, Black GC, Downey LM, Zhang K & Inglehearn CF, 2004. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* **74**: 721- 730.

van Leeuwen JP, van den Bemd GJ, van Driel M, Buurman CJ & Pols HA, 2001. 24,25-Dihydroxyvitamin D(3) and bone metabolism. *Steroids* **66**: 375– 380.

Väänänen HK, 1996. Luun elämäankaari. Aikakauskirja Duodecim 112: 2087- 2094.

Wada S, Fukawa T, & Kamiya S, 2007. Osteocalcin and bone. *Clin Calcium* **17**: 1673- 1677.

Wagner EF & Karsenty G, 2001. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 527- 532.

Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K & Beresford JN, 2001. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* **40**: 74- 83.

Wang HY & Malbon CC, 2003. Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* **300**: 1529- 1530.

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A & DiNardo S, 2000. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**: 527- 530.

Westendorf JJ, Kahler R.A & Schroeder T.M, 2004. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* **341**: 19- 39.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates III JR & Nusse R, 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448- 452.

Wohnik GM, Young JC, Schmidt U, Holsboer F, Hartl FU & Rein T, 2004. Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Lett* **560**: 35- 38.

Wolf J, Palmby TR, Gavard J, Williams BO & Gutkind JS, 2008. Multiple PPPS/TP motifs act in a combinatorial fashion to transduce Wnt signaling through LRP6. *FEBS Lett* **582**: 255- 261.

Woolf AD, 2007. An update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* **19**: 370- 375.

Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B & Sun Z, 2002. Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem* **277**: 11336- 11344.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E & Morinaga T, 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **95**: 3597- 3602.

Zallone A, 2006. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci.* **1068**: 173- 179.

Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, Zhao S, Harris M, Harris SE, Feng JQ & Bonewald LF, 2006. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol* **26**: 4539- 4552.

Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ & Boman BM, 2001. Evidence that APC regulates survivin expression: A possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* **61**: 8664– 8667.

Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S & Wu D, 2004. The LRP5 high bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Mol Cell Biol* **24**: 4677- 4684.

Zhao H & Patrick Ross F, 2007. Mechanisms of osteoclastic secretion. *Ann N Y Acad Sci.***1116**: 238- 244.